Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Staib)

Untersuchungen zur Biosynthese von Testosteron in isolierten und hochangereicherten Leydig-Zellen adulter streptozotozin-diabetischer Ratten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Detlev-Rainer Waldenburger

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535716_0057

Meinen Eltern

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Staib)

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON TESTOSTERON IN ISOLIERTEN UND HOCHANGEREICHERTEN LEYDIG-ZELLEN ADULTER STREPTOZOTOZIN-DIABETISCHER RATTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

DETLEV-RAINER WALDENBURGER

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. H.Th. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. W. Staib

Korreferent
gez.: Prof. Dr. H. Kley

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	EINTEILUNG DER VERSUCHE	5
3.	MATERIAL UND METHODIK	8
3.1	Behandlung der Tiere	8
3.2	Präparation der Leydig-Zellen	8
3.3	Inkubationen der Leydig-Zellen	12
3.4	Radioimmunoassay für Testosteron	13
3.5	Auftrennung und Quantifizierung der Metabolite von Pregnenolon und Progesteron	15
3.6	Kinetiken des Pregnenolon- und Progesteronumsatzes	17
3.7	Kontrollversuche	17
3.8	Berechnungen und Statistik	18
4.	ERGEBNISSE	20
5.	TABELLEN (2 - 4)	30
6.	ABBILDUNGEN (2 - 12)	33
7.	DISKUSSION	50
7.1	Zur Methodik	50
7.2	Rahmenparameter	58
7.3	Zeitverlauf der Testosteronsynthese nach hCG-Stimulation	60
7.4	Stimulation der Testosteronsynthese durch Dibutyryl-cAMP	66
7.5	Präcursorstudien mit Pregnenolon und Progesteron; Zeitverlauf	67
7.6	Umsatz verschiedener Konzentrationen der Präcursoren Pregnenolon und Pregesteron	72
8.	ZUSAMMENFASSUNG	74
9.	LITERATURVERZEICHNIS	75
	DANKSAGUNG	85
	LEBENSLAUF	86

1. EINLEITUNG

Erhebliche Einschränkungen der Fertilität männlicher Diabetiker sind wohlbekannte Folgeerscheinungen des klinischen Diabetes mellitus (1). Dieser Befund sowie die dem zugrundeliegenden pathologischen Veränderungen an den Gonaden lassen sich auch bei experimentell erzeugtem Diabetes am Tier reproduzieren (2 - 5). Beim Studium derartiger Störungen haben diverse Tiermodelle Verwendung gefunden, unter anderem die 95 %ig pankreatektomierte Ratte (2, 3), genetisch diabetische (Typ db/db) oder fettsüchtige (Typ ob/ob) Mäuse (6, 7) sowie Ratten, die nach Applikation der selektiv β-cytotoxischen Substanzen Alloxan (8 - 1o) oder Streptozotozin (= STR, 4, 5, 8, 11) einen Diabetes mellitus mit hohen Blutglucosespiegeln entwickeln. Als besonders geeignet hat sich in letzter Zeit die STR-diabetische Ratte erwiesen, weil sich bei ihr eine in ihren Ausprägungen relativ einheitliche Form des Insulinmangeldiabetes ausbildet (8), abschätzbar anhand von Blut- und Uringlucosespiegeln, Urinvolumen und Flüssigkeitsbedarf, mit überdies deutlichen und bei Fortbestehen des Diabetes progredienten Veränderungen an Testes und akzessorischen Geschlechtsorganen (4).

Bisherige Forschungsarbeiten an STR-diabetischen Ratten beschränken sich überwiegend auf die morphologischen Störungen im Hoden. In Übereinstimmung mit Beobachtungen an anderen Tiermodellen und an männlichen Diabetikern (1, 3) lassen sich Schäden in der Spermiogenese, vor allem bei den Stufe 7-Spermatiden (4) und Atrophie der Tubuli seminiferi (4, 5) sowie

Atrophien der androgenabhängigen akzessorischen Geschlechtsorgane, d.h. von Samenblasen und Prostata (4, 5, 8), nachweisen. Über den entsprechenden hormonellen Status im Diabetes und die endokrine Hodenfunktion - für die vor allem die zur Steroidsynthese fähigen sog. Leydig'schen Zwischenzellen im peri- und intertubulären Bindegewebe verantwortlich sind (12 - 15) - ist dagegen nur wenig bzw. Widersprüchliches bekannt. Man hat nachweisen können, daß die STR-diabetische Ratte reduzierte Serumtestosteronspiegel hat (5, 8, 16), und daß der Hoden in vitro vermindert Testosteron synthetisiert (5, 8, 17). Diese Veränderungen sind ebenso wie die morphologischen Störungen beim Diabetes bisher auf primäre Schäden an der Hypophyse im Sinne eines hypogonadotropen Hypogonadismus zurückgeführt worden (4, 5, für andere Tiermodelle vgl. 3, 10). Es lassen sich nämlich auf morphologischer Ebene deutliche Parallelen zu Befunden aus Untersuchungen an hypophysektomierten Tieren (z.B. 18) ziehen. Außerdem ist bekannt, daß STR-diabetische Ratten (5, 8), aber auch andere diabetische Tiere (10), ebenso wie der diabetische Mann, im allgemeinen reduzierte Spiegel von Lutropin (= LH) im Serum aufweisen.

Eingehendere Untersuchungen über den Leydig-Zellstoffwechsel und die Abklärung eventueller Störungen desselben sind erst möglich, seitdem es gelungen ist, die Leydig-Zellen, welche weniger als 2 % des Testisvolumens von Ratten ausmachen (19), aus dem Gewebeverbund zu isolieren (13, 14, 20, 21) und hochgradig anzureichern. Dabei erfolgt die Isolierung in neuerer Zeit vor allem durch enzymatische Auflösung des Gewebes mittels Collagenase.
Zur weiteren Anreicherung separieren die verschiedenen

Arbeitsgruppen Testis-Zellsuspensionen über Ficoll- (22, 23), Metrizamid- (23) und neuerdings Percoll- (24, 25) Dichtegradienten. Bisher haben die genannten Verfahren aber noch keine Anwendung auf Leydig-Zellen diabetischer Ratten gefunden.

An isolierten, aber nicht angereicherten Testis-Zellsuspensionen hat man in jüngster Zeit Verluste an Gonadotropinrezeptoren bei STR-diabetischen Ratten nachweisen können, die durch Insulingaben vollständig reversibel sind (26). Über die Signifikanz dieses Phänomens für die endokrine Funktion des Hodens in vivo ist ebenso nichts bekannt wie über die Möglichkeit, daß - abhängig oder unabhängig vom LH-Rezeptorverlust - bestimmte in die Testosteronsynthese involvierte Enzyme in ihrer Aktivität vermindert sein könnten. Es gibt lediglich einen Hinweis (17), wonach die Enzyme, die NADPH regenerieren, einen Cofaktor bestimmter testosteronsynthetisierender Enzyme, beim STR-Diabetes in ihrer Funktion eingeschränkt sind und dadurch auch die Testosteronsynthese in gewissem Umfang vermindert abläuft.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, zunächst zu prüfen, ob an hochangereicherten Leydig-Zellen STR-diabetischer Ratten überhaupt eine Störung der Testosteronsynthese in vitro vorliegt, wobei sowohl die Geschwindigkeit als auch das Ausmaß der Leydig-Zell-Antwort auf exogene Stimulation mit humanem Choriongonadotropin (=hCG) in vitro berücksichtigt werden sollen. Darüber hinausgehend sollen anhand

des Umsatzes von Präcursoren der Testosteronsynthese, der als Parameter für die Enzymaktivität dient, evtl. vorhandene Defekte an den beteiligten steroidsynthetisierenden Enzymen lokalisiert werden.

2. EINTEILUNG DER VERSUCHE

1: Versuche zur in vitro-Stimulierbarkeit der Leydig-Zellen

In einer ersten Versuchsreihe wird der Verlauf der Testosteronsynthese von isolierten Leydig-Zellen normaler adulter Ratten über 45o Minuten hinweg untersucht. Dies geschieht basal und nach in vitro-Stimulation der Leydig-Zellen mit hCG in Konzentrationen von 1 ng und 1 µg/ml Inkubationsmedium. In gleicher Weise werden Versuchsreihen mit Ratten durchgeführt, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung ein mit STR induzierter Diabetes mellitus von 3 bzw. 6 Wochen Dauer besteht. Schließlich erfolgen Stimulationsversuche an Leydig-Zellen von normalen Ratten und solchen mit 6 Wochen bestehendem Diabetes unter Verwendung von verschiedenen Konzentrationen an cyclischem Adenosinmonophosphat (= cAMP) in Form des membrangängigen Di-butyrylderivates.

2: Versuche mit Präcursorzusatz

Leydig-Zellen von unvorbehandelten Ratten und solchen mit einem Diabetes von 6 Wochen Dauer werden unter Zugabe von ^{14}C-markiertem Pregnenolon bzw. Progesteron inkubiert und die Aktivitätsverteilung in den einzelnen entstehenden Metabolitfraktionen identifiziert und über die Zeit gemessen. Schließlich werden an Leydig-Zellen von nichtdiabetischen und diabetischen Tieren die Umsetzungsraten unterschiedlicher Mengen an Pregnenolon und Progesteron bestimmt.

Eine genaue Übersicht über die einzelnen Versuchsreihen gibt Tabelle 1.

TABELLE 1 Übersicht über die Hauptversuchsreihen

Gruppe		Verwendete Ratten	Stimulation / Inkubationsbedingungen	gemessener Parameter	n=
1) ohne Präcursoren	A	Unvorbehandelte (= N) Ratten	a) basal b) + 1 ng hCG/ml Ansatz c) + 1 µg hCG/ml Ansatz	Verlauf der Testosteronsynthese während 45o Minuten	15
	B	Ratten, denen α) 3 bzw. β) 6 Wochen vor dem Versuch 1oo mg STR/kg KG i.p. injiziert wird	wie in 1) A	wie in 1) A	α: 13 β: 11
	C	N- Ratten	variierte Dibutyryl-cAMP-Konzentrationen im Bereich von $6 \times 1o^{6}$ bis $6 \times 1o^{3}$ pMol/ Ansatz	Testosteronsynthese nach 18o Minuten	5
	D	wie in 1) B β vorbehandelte Ratten	wie in 1) C	wie in 1) C	5

2) mit Präcursoren	A	N- Ratten	a) basal b) + 1 µg hCG/ml Zusatz von 75o pMol ^{14}C Progesteron pro Ansatz	Metabolite von ^{14}C-Progesteron	7
	B	wie in 1) Bβ vorbehandelte Ratten	wie in 2) A	wie in 2) A	5
	C	N- Ratten	a) basal b) + 1 µg hCG/ml Zusatz von 46o pMol ^{14}C Pregnenolon pro Ansatz	Metabolite von ^{14}C-Pregnenolon	7
	D	wie in 1) Bβ vorbehandelte Ratten	wie in 2) C	wie in 2) C	5
	E	N- Ratten	basal; Zusatz von 5o, 1oo, 25o, 5oo, 1ooo, 25oo pMol ^{14}C-Progesteron pro Ansatz	Metabolisierung von ^{14}C-Progesteron	5
	F	wie in 1) Bβ vorbehandelte Ratten	wie in 2) E	wie in 2) E	5
	G	N- Ratten	basal; Zusatz von 5o, 1oo, 25o, 5oo, 1ooo, 25oo pMol ^{14}C-Pregnenolon pro Ansatz	Metabolisierung von ^{14}C-Pregnenolon	5
	H	wie in 1) Bβ vorbehandelte Ratten	wie in 2) G	wie in 2) G	5

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Behandlung der Tiere

Für alle Versuche werden adulte männliche Albinoratten mit einem Gewicht von 2oo - 25o g verwendet (Typ Wistar 2, Inzuchtstamm, Versuchstierlaboratorien der Universität Düsseldorf). Alle Kontrolltiere erhalten bis zum Versuchstag Standardfutter (Altromin, Fa. Höveler, Langenfeld) und Wasser ad libitum.

Bei einem Teil der Tiere wird künstlich ein Diabetes mellitus erzeugt. Dazu wird eine einmalige Dosis von o,5 ml einer frisch angesetzten Lösung von STR (Fa. Calbiochem, Gießen) in 1o mmol/l Citratpuffer, pH 4,5 (entsprechend einer Dosis von 1oo mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht (zur Übersicht vgl. 11). Der diabetische Status manifestiert sich, wie durch Nachweis einer Glucosurie festzustellen ist, bereits nach 24 Std.; er wird zweimal pro Woche durch Messung des Blutglucosespiegels im Schwanzvenenblut mit einem Reflektometer (Fa. Ames) kontrolliert. Bei den diabetischen Ratten wird außerdem eine Blutglucosebestimmung nach 24-stündigem Futterentzug vorgenommen. Im übrigen erfolgt die Haltung dieser Tiere wie bei den Kontrollratten.

3.2 Präparation der Leydig-Zellen

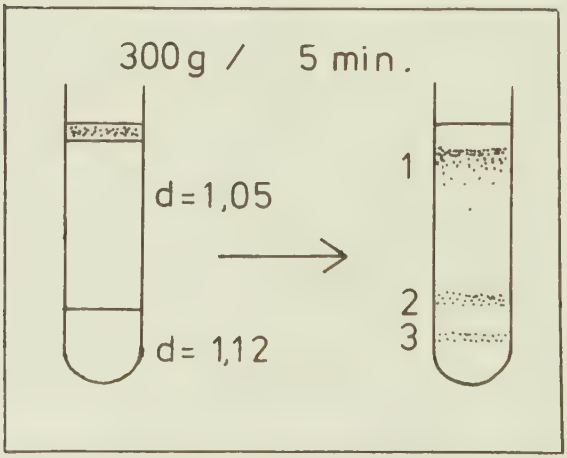
Alle bei der Präparation verwendeten Glasgeräte werden vor Gebrauch silikonisiert, um eine Adsorption von Zellen an die Glaswände möglichst zu vermeiden.

Die Tiere werden durch Nackenschlag getötet und die Testes entnommen, gewogen und entkapselt. Danach inkubiert man die Testes jeder Ratte in einem 2o ml fassenden wasserdichten Glasfläschchen mit einer Lösung von 8 mg Collagenase (Fa. Boehringer, Mannheim) in 8 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer unter Zusatz von 1 g/l Glucose (= KRBG-Puffer) im Schüttelwasserbad bei 34 ^{o} C. Aus dem desintegrierten Gewebe werden durch mehrmaliges Dekantieren und zweimaliges Filtrieren durch Nylongaze mit zunächst 2oo µm und danach 8o µm Porengröße die Tubuli und große Zellaggregate entfernt, die auf dem Filter zurückbleiben. Die so vorgereinigte Zellsuspension wird nun in weite Zentrifugengläser überführt, mit KRBG-Puffer gewaschen und anschließend 1o Minuten bei 6ox g und 2 ^{o} C in einer Kühlzentrifuge (Fa. Heraeus) zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes werden die sedimentierten Zellen von 2 Testes in 1 ml KRBG-Puffer aufgenommen und erneut resuspendiert. Zur weiteren Anreicherung wird diese Zellsuspension vollständig auf einen Percoll-Stufengradienten aufgetragen. Dieser Gradient besteht aus einer unteren Schicht von 3 ml 9o %igem Percoll^{R} (Fa. Pharmacia, Freiburg) mit einer Dichte von ρ = 1,12 g/cm^{3} und einer oberen Schicht von 8,9 ml 35 %igem Percoll (ρ = 1,o5 g/cm^{3}) mit einem Zusatz von 2 g/l Albumin (Rinderserumalbumin, Fa. Behring, Marburg). Das Percoll wurde dabei durch den Zusatz von 9 %igem NaCl isoosmotisch gemacht. Die Dichten der beiden Schichten werden bestimmt mit "density marker beads" (Fa. Pharmacia). Der beladene Gradient wird 5 Minuten mit 3oox g bei 2 ^{o} C zentrifugiert. Danach ergeben sich mehrere diskrete Banden, wie aus Abb. 1 zu ersehen ist.

ABBILDUNG 1

TRENNUNG DER TESTIS-ZELLEN DURCH PERCOLL^{R}-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION (SCHEMATISCH)

Links mit 1 ml Testiszellsuspension belandener Zweistufengradient (genauere Daten siehe Text); rechts Gradient nach der Zentrifugation mit 3oo x g: Fraktion 1 enthält hauptsächlich Keimzellen aus der Spermatogenese, Fraktion 2: Leydig-Zellen, Fraktion 3: Erythrozyten



Die obere Bande wird verworfen, die Leydig-Zell-Fraktion mit Pasteurpipetten abgehebert und in 5 ml minimal essential medium (MEM Eagle + Earleś salts, Fa. Serva, Heidelberg, unter Zusatz von 2 mmol/l Glutamin, Fa. Serva) aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 8ox g bei 2 °C werden die sedimentierten Zellen in 2 ml MEM aufgenommen und in einer Neubauerkammer gezählt.

Der Nachweis der Leydig-Zellen und die Bestimmung ihres Anteils in den Zellsuspensionen wird enzymhistochemisch mit zwei verschiedenen Verfahren durchgeführt:

a) durch Darstellung der Steroid-3β-ol-Dehydrogenase-Aktivität nach dem Verfahren von Levy et al. (27) und Wiebe (28):

Man läßt die isolierten Zellen auf dem Objektträger für einige Minuten antrocknen und inkubiert dann ca. 40 Minuten in o,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 8,o,in dem o,44 mmol/l Tetranitroblau- Tetrazoliumchlorid (= TNBT), 1,32 mmol/l NAD^+ und o,21 mmol/l 5α-Androstan-3β-ol-17-on in Methanol enthalten sind.

b) durch Darstellung der Aktivität der unspezifischen Esterase nach Rommerts et al. (21), Lojda et al. (29) und Kühn-Velten et al. (30):

Hierbei erfolgt die Inkubation mit o,1 mol/l Phosphatpuffer,pH 7,5, unter Zusatz von 4 mmol/l p-Rosanilin-Hydrochlorid, 55 mmol/l $NaNO_2$ und 1,7 mmol/l 1-Naphthylacetat in Azeton. Dieses Verfahren benötigt etwa 2 - 3 Minuten. Danach werden bei beiden Verfahren die Objektträger mit Wasser abgespült, in 4 %igem Formalin fixiert, abermals abgespült und in

Glyzeringelatine eingebettet. Die gleichen Reaktionen können auch in Inkubationsfläschchen zwecks späterer Zählung der Zellen in der Neubauer-Kammer durchgeführt werden.

3.3 Inkubation der Leydig-Zellen

Die suspendierten Leydig-Zellen jeder Ratte werden auf eine Serie von Versuchsansätzen verteilt, wobei für jeden Meßzeitpunkt ein Ansatz erstellt wird, der ca. 2×10^5 Zellen in 0,4 ml MEM enthält. Dazu werden 0,2 ml einer nach Bestimmung der Zellzahl entsprechend eingestellten Leydig-Zell-Suspension und 0,2 ml einer zellfreien MEM-Lösung mit Zusätzen entsprechend Tab. 1 in ein Reagenzglas mit wasserdichtem Schraubverschluß (Fa. Sovirel) pipettiert. Alle Inkubationen finden in einem Wasserbad bei 34 °C unter ständigem Schütteln (ca. 100 Schüttelbewegungen pro Minute) statt. Bei den Versuchsreihen ohne Präcursoren werden Ansätze mit 0', 30', 60', 120', 180' und 450' Versuchsdauer gewählt, bei den Versuchsreihen mit radioaktiven Präcursoren zusätzliche Ansätze für 5' und 15' Inkubationsdauer. Die Ansätze für die Metabolisierungskinetiken von Pregnenolon und Progesteron (2 E - H in Tab. 1) werden 0', 15' und 120' inkubiert, die Proben mit variierenden Konzentrationen von Db-cAMP 0' und 180' (1 C-D in Tab. 1). Die Inkubation der Ansätze wird zu den entsprechenden Zeiten durch Herausnahme aus dem Wasserbad und Zugabe von 5 ml Diäthyläther gestoppt.

Um der Frage nach einer Testosteronproduktion durch möglicherweise nicht mehr intakte Leydig-Zellen nachzugehen, haben wir Versuche mit Leydig-Zell-Homogenaten durchgeführt. Dabei wird eine 30-minütige Vorinkubation der noch intakten Zellen in einer den end-

gültigen Ansätzen entsprechenden hCG-Konzentration in einem kleinen Erlenmeyerkolben vorgeschaltet, um die Beladung der hCG-Rezeptoren zu gewährleisten. Anschließend erfolgt die Homogenisierung der Zellen für 1 Minute entweder mit einer Ultraschallsonde (Braun Sonic, Fa. Braun Melsungen) oder mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (Fa. Ika). Unmittelbar darauf werden jeweils o,4 ml der Suspension in Sovirelgläser zur weiteren Inkubation eingefüllt.

3.4 Radioimmunoassay für Testosteron

Die Proben werden zweimal mit je 5 ml Diäthyläther extrahiert und im Wasserbad zur Trockne eingedampft. Anschließend werden sie in Methanol aufgenommen, verdünnt, in Doppelwerte aufgeteilt und erneut eingedampft. Als Lösungen für den Radioimmunoassay (= RIA) werden verwendet:

a) Diluent

1 g γ-Globulin (Fa. Behring, Marburg) wird in 1 l o,9 %iger NaCl gelöst.

b) Antikörper

Das Antikörperserum ist nach der Methode von Nieschlag et al. (31) hergestellt worden. Es wird für den RIA in Diluent zu einer Endverdünnung von 1 : 1oooo aufgenommen. Die Kapazität des unverdünnten Antiserums beträgt $4,7 \times 1o^{-6}$ mol/l, die Assoziationskonstante in der 1 : 2oooo Verdünnung $5,8 \times 1o^{9}$ l/Mol.

c) ^{3}H-Testosteron

Das in Benzol gelöste ^{3}H-Testosteron (Fa. New England Nuclear) wird unter N_2 zur Trockne eingedampft und anschließend in Diluent zu einer Endkonzentration von ca. 3 x 10^4 cpm/ml aufgenommen.

d) Dextran-beschichtete Aktivkohle

Je 250 mg Aktivkohle (Norit A) und Dextran T 70 (Fa. Pharmacia) werden in 100 ml Diluent gelöst und über mehrere Stunden, vor Gebrauch außerdem noch einmal mindestens 20 Minuten, im Eisbad vorsichtig gerührt.

Für die Bestimmung der Gesamtaktivität (= T-Wert), Bindungskapazität (= O-Wert) und unspezifischen Bindung (= U-Wert) sowie für die mitgeführten Standardwerte, die einen Bereich von 25 pg bis 5 ng abdecken, werden Dreifachwerte eingesetzt.

In die Röhrchen der Proben und Standards sowie der O-Werte werden jeweils 500 µl Antikörperlösung und 500 µl ^{3}H-Testosteronlösung pipettiert, für den T-Wert werden 500 µl ^{3}H-Testosteron plus 1000 µl Diluent eingesetzt und für den U-Wert 500 µl ^{3}H-Testosteron plus 500 µl Diluent. Nach vorsichtigem Schütteln werden die Proben dann für ca. 18 Stunden (über Nacht) in der Kühlkammer bei 2 °C äquilibriert. Danach setzt man den Proben - außer den T-Werten - jeweils 500 µl Aktivkohle zu, inkubiert 12 Minuten bei 0 °C und zentrifugiert anschließend die Kohle 10 Minuten bei 2400 x g ab. 500 µl des klaren Überstandes werden in Plastikszintillationsgefäße pipet-

tiert und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 212, Fa. Zinsser) versetzt. Nach gründlichem Mischen und Kühlstellen für etwa 3o Minuten wird in einem Tricarb 2425 (Packard Instruments Comp. Inc. efficiency für Tritium η = 23 %) die Radioaktivität gezählt.

3.5 Auftrennung und Quantifizierung der Metabolite

Den einzelnen Ansätzen werden zur Inkubation als Präcursor entweder 75o pMol 4-^{14}C-Progesteron (spez. Aktivität 36,1 mCi/mMol, Fa. Amersham Buchler, Braunschweig) oder 46o pMol 4-^{14}C-Pregnenolon (spez. Aktivität 55,7 mCi/mMol, Fa. New England Nuclear, Dreieichenhain) zugesetzt. Nach der Inkubation werden die einzelnen Ansätze wie für den RIA zunächst zweimal mit Äther extrahiert und zur Trockne eingedampft. Die trockenen Rückstände jeder Probe werden dann in 2oo µl Methanol aufgenommen und mit 5o µl-Mikrokapillaren auf Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen (Schichtdicke o,25 mm mit Fluoreszenzindikator, 2o x 2o cm, Nr. 6oF254, Fa. Merck, Darmstadt). Alle Probenröhrchen werden noch jeweils zweimal mit 5o µl Methanol nachgespült und dieses ebenfalls auf dieselbe Stelle aufgetragen. Die einzelnen "Start"-Linien sind 3 cm breit und 1,2 cm voneinander entfernt. Die Platten werden zweimal in Chloroform: Äthylazetat 7o : 3o entwickelt. Bei einer Laufstrecke von 17,5 cm resultieren daraus für die einzelnen Metabolite folgende r_f-Werte:

1.	Progesteron	o,76 - o,78
2.	Androst-4-en-3,17-dion	o,68 - o,7o
3.	Pregnenolon	o,61 - o,64
4.	17α-OH-Progesteron	o,5o - o,53
5.	Testosteron	o,44 - o,47

Die Lokalisierung der einzelnen Steroidfraktionen erfolgt unter Verwendung von Röntgenfilmen (Osray T 4, 18 x 24 cm, Fa. Agfa Gevaert, Leverkusen), die auf den DC-Platten befestigt und dann 5 - 6 Tage belichtet werden. Die Banden werden ausgekratzt und in mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipetten überführt. Die Steroide werden dann mit einem Gemisch von Dichlormethan : Methanol 8o : 2o zweimal aus dem Kieselgel eluiert, - zunächst mit 8 ml, nachfolgend nochmals mit 5 ml - und jeweils im Wasserbad zur Trockne eingedampft. Schließlich werden diese Extrakte der einzelnen Steroidfraktionen in jeweils 5oo µl Methanol aufgenommen und pro Fraktion 2 x 1oo µl in Szintillationsgefäße pipettiert. Dazu werden 4 ml eines selbst hergestellten Szintillators (7 g 2,5-Diphenyloxazol [= PPO] + o,2 g 2,2'-Phenylen-bis-4Methyl-5-Phenyloxazol [= Dimethyl-POPOP] in 1 l Toluol) gegeben und gründlich gemischt. Anschließend läßt man die Proben 3o Minuten in der Kühlkammer stehen und zählt danach die Radioaktivität in einem Tricarb 2425. Die Zählraten der Metabolite einer Probe werden addiert und auf die ursprünglich eingesetzte Menge an radioaktivem Material bezogen. Die Wiederfindungsrate beträgt im Mittel 65 %. Eine Backgroundkorrektur ist nicht erforderlich, da die unspezifische Radioaktivität auf den DC-Platten sehr niedrig liegt ($<$ 2o cpm/1oo µl).

Die Identifizierung der Metabolite erfolgt mit einem VarianMat CH7A Massenspektrometer, das in einer offenen Kopplung nach Henneberg an einen Varian 17oo Gaschromatographen mit einer Glaskapillarsäule (15 mOV 1o1) angeschlossen ist. Der Gaschromatograph wird isotherm mit einer Temperatur von 25o ^{o}C betrieben.

3.6 Kinetiken des Pregnenolon- und Progesteronumsatzes

Den Inkubationsansätzen wird ^{14}C-markiertes Pregnenolon bzw. Progesteron in steigenden Mengen von 5o-25oo pMol/Ansatz (siehe Tab. 1) zugegeben. Die Aufarbeitung erfolgt, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, mittels Dünnschichtchromatographie. Es werden nur die Fraktionen des jeweiligen Präcursors eluiert und deren Aktivität in einem Aliquot gezählt. Die Zählraten werden dann auf entsprechende mitgeführte Leerwerte ohne Zellzusatz (=O-Werte) bezogen, um die methodisch bedingten Verluste an radioaktiver Substanz auszugleichen. Die Recovery beträgt auch hier im Mittel 65 %.

3.7 Kontrollversuche

Zum Ausschluß einer direkten STR-Toxizität wird Leydig-Zellen nichtdiabetischer Ratten STR in einer Konzentration von o,o5 mg/ml Inkubationsmedium zugesetzt und in üblicher Weise bis 7,5 Stunden inkubiert. Den Einfluß eines sauren pH auf die Inkubation haben wir in Serien mit Leydig-Zellen von ebenfalls nichtdiabetischen Ratten, in deren Inkubationsmedium der pH durch Citratpuffer auf 7,1 bzw. 6,3 eingestellt wird, bestimmt. Zur Untersuchung des Testosteronabbaus in Leydig-Zellen nichtdiabetischer Tiere haben wir zwei Inkubationsserien parallel durchgeführt: zum einen wird 5o ng unmarkiertes Testosteron den Ansätzen zugefügt und das Hormon nach O′, 15′, 3o′, 6o′, 12o′, 18o′und 45o′radioimmunologisch bestimmt; zum anderen werden 5o ng unmarkiertes Testosteron und 35ooo cpm ^{3}H-Testosteron zugesetzt. Die Bestimmung erfolgt hier nach DC-Trennung des Testosterons durch Zählung

der Radioaktivität des markierten Hormons in einem Tricarb 2425. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus n= 2 Versuchsserien angegeben, eine Berechnung und Darstellung der Standardabweichung entfällt daher.

3.8 Berechnungen und Statistik

Bei der Auswertung des Radioimmunoassays wird zunächst die Bindung der Tracerdosis Testosteron (in Abwesenheit unmarkierten Hormons) an den Antikörper bei dem aktuellen Antikörpertiter bestimmt und nach Abzug der unspezifischen Bindung in Relation zur eingesetzten Gesamtaktivität - auch hierbei erfolgt eine Korrektur um die unspezifische Bindung - gesetzt. Dieser Wert wird als Bindungskapazität bezeichnet. Im Verhältnis zu diesem Wert wird die relative Beladung des Antikörpers in den Proben und Standards in % der Bindungskapazität ausgedrückt. Für die Aufstellung der Standardkurve werden die prozentualen Bindungswerte der Standards gegen deren Nennkonzentration (in pg/Ansatz) aufgetragen, wobei sich unter Verwendung von logit-log-Papier eine lineare Abhängigkeit ergibt.

Die Testosteronproduktion in den Versuchen der Gruppe 1 (Tab. 1) wird in pMol/2 x $1o^5$ Zellen angegeben. Teilweise werden diese Werte in pMol/Testis umgerechnet. Die Konzentrationen der Metabolite in den Präcursorstudien werden in % des jeweils eingesetzten Präcursors angegeben und dann absolut zu pMol/Ansatz umgerechnet.

Die Ergebnisse sind mit dem t-Test nach Student ausgewertet, Signifikanzschranke ist 2 $p < o,o5$.

Im allgemeinen sind die Ergebnisse als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ angegeben. Für die Abb. 2 (Blutglucosespiegel der diabetischen Ratten) haben wir allerdings die mittleren Tagesglucosespiegel als empirischen Median $\tilde{x}$ ohne Standardabweichung dargestellt. Dies ist deswegen nötig, weil das Reflektometer nur einen beschränkten Meßbereich bis max. 4 g/l hat und somit ein großer Teil der Einzelmeßwerte nur ungenau als > 4 g/l angegeben werden kann.

4. ERGEBNISSE

Die für die Versuche verwendeten diabetischen Ratten weisen bereits 2 Tage nach der intraperitonealen STR-Injektion von 1oo mg/kg Körpergewicht im Blut Glucosespiegel von mehr als 3 g/l auf. Nach ca. 1 Woche pendeln sich die Werte bei Spiegeln $\geq$ 4 g/l ein und bleiben im Verlauf von 6 Wochen bis zum Versuchstag konstant (Abb. 2). Lediglich 1 Tier, das mehr als dreimal postprandiale Glucosespiegel unter 3 g/l zeigt, haben wir vom Versuch ausgeschlossen.

Die Serumtestosteronspiegel diabetischer Ratten liegen mit 2,1 $\pm$ o,2 ng/ml signifikant (2 $p < o,oo1$) niedriger als die normaler Tiere, die Spiegel von 5,1 $\pm$ o,3 ng/ml aufweisen (Tab. 2).

Dieser erheblichen Reduktion des Hauptandrogens im Blut stehen nahezu unveränderte Hodengewichte gegenüber (Tab. 2). Als Ursache kommt zunächst eine verminderte Anzahl an Leydig-Zellen in den Testes der diabetischen Ratten in Betracht: Aus Testes normaler Ratten können im Mittel 4,4 $\pm$ o,5 x $1o^7$ Zellen pro Testis isoliert werden; mittels cytochemischer Darstellung der Aktivitäten der 3β-ol-Dehydrogenase und der unspezifischen Esterase können 1o,2 % dieser Zellen als Leydig-Zellen identifiziert werden. Es befinden sich also insgesamt 4,5 $\pm$ o,3 x $1o^6$ Leydig-Zellen in dieser Zellsuspension. Durch die Gradientenzentrifugation kann der Anteil der anfärbbaren Zellen in der Suspension um einen Faktor 8,6 auf 87,7 % gesteigert werden. Es sind dann noch 3,22 $\pm$ o,29 x $1o^6$ Leydig-Zellen pro Testis vorhanden; das entspricht einer Ausbeute von 68 %, bezogen

auf die ursprüngliche Anzahl isolierter Leydig-Zellen in der ungereinigten Suspension. Testes diabetischer Ratten enthalten demgegenüber weniger Leydig-Zellen. Nach 6 Wochen bestehendem Diabetes mellitus vermindert sich die Zahl der enzym-cytochemisch anfärbbaren Zellen, die nach der Gradientenzentrifugation noch zur Verfügung stehen, auf $1{,}64 \pm 0{,}2 \times 10^6$ Leydig-Zellen, das sind 51 % der bei den Normaltieren vorliegenden Zellzahl ($2\ p < 0{,}005$).

Für die verminderten Serumtestosteronspiegel kommt aber als Ursache nicht nur die reduzierte Anzahl an Leydig-Zellen in Frage, sondern überdies eine Störung im hormonproduzierenden System der einzelnen Zelle.

Bei Inkubationen isolierter Leydig-Zellen über 7,5 Stunden mit standardisierter Zellzahl pro Ansatz ist die Testosteronsynthese normaler Ratten durch Zusatz von hCG deutlich stimulierbar (Abb. 3 a). Die verwendeten hCG-Konzentrationen - 1 ng hCG/ml Medium und 1 µg hCG/ml Medium - bewirken etwa 20 % bzw. annähernd 100 % der maximal möglichen Stimulation. Mit 1 ng hCG/ml inkubierte Leydig-Zellen synthetisieren bereits hochsignifikant mehr Testosteron als solche ohne Zusatz von hCG ($2\ p < 0{,}02$ bei 1 Std., $2\ p < 0{,}001$ ab 2 Std.), Zusatz von 1 µg hCG/ml Medium steigert die Syntheseraten noch weiter, so daß die Werte deutlich über denen in Gegenwart von 1 ng hCG/ml liegen ($2\ p < 0{,}001$ ab 30 Min.).

Inkubiert man unter den gleichen Bedingungen Leydig-Zellen diabetischer Ratten, fällt zunächst eine mit der Dauer des Diabetes zunehmende Verminderung der Syntheseleistung unter hCG-Stimulation auf (Abb. 3b und 3c), während die basalen Syntheseraten ohne

hCG-Zusatz nicht von denen der Kontrollen abweichen. Während drei Stunden produzieren Leydig-Zellen der Kontrolltiere bei Zusatz von 1 ng hCG/ml 8,5 mal mehr Testosteron als ohne Stimulation; bei einer hCG-Konzentration von 1 µg/ml beträgt der Faktor 17,2. Besteht bei den Versuchsratten seit 3 Wochen ein Diabetes, sinken diese Stimulationsfaktoren bei dreistündiger Inkubation auf 5,1 bzw. 11,2; besteht der Diabetes 6 Wochen, liegen sie nur noch bei 4,8 bzw. 1o,6. Die gemessenen absoluten Syntheseraten liegen aber auch für diese Versuchsgruppe immer noch signifikant über der Basalproduktion unstimulierter Zellen, bei der geringeren hCG-Konzentration jenseits von 2 Stunden, bei 1 µg/ml bereits jenseits von 1 Stunde Inkubationsdauer.

Die Leydig-Zellen der diabetischen Tiere sprechen aber nicht nur in geringerem Ausmaß auf die Stimulation an, sie reagieren zudem verzögert. Die Phase maximaler Synthese - entsprechend der größten Steigung in der Produktionskurve (Abb. 3 a - c) - liegt bei den Kontrollen zwischen 1 und 2 Stunden nach Inkubationsbeginn; diabetische Tiere 3 Wochen nach STR-Injektion zeigen eine solche Synthesesteigerung erst nach 2 - 3 Stunden, und bei Bestehen eines Diabetes von 6 Wochen Dauer liegt das Maximum sogar erst jenseits von 3 Stunden.

Bezieht man nun die gemessenen Syntheseraten (im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Ergebnissen) nicht auf eine standardisierte Zellzahl von $2 \times 1o^5$ Leydig-Zellen, sondern auf 1 Testis, und berücksichtigt damit auch noch die nachgewiesene Abnahme an Leydig-Zellen im Verlauf des Diabetes, tritt die Synthesestörung noch deutlicher hervor (Abb. 4). Sogar die basalen

Syntheseraten liegen dann erheblich unter denen der Kontrollen ($2\,p < 0{,}001$).

Daß die beschriebenen endokrinen Veränderungen tatsächlich Folge des Diabetes mellitus sind, und nicht etwa auf einem direkten toxischen Effekt des STR auf die Leydig-Zelle beruhen, kann in entsprechenden Kontrollversuchen nachgewiesen werden: bei Zusatz von 0,5 mg/ml STR zum Inkubationsansatz mit Leydig-Zellen unvorbehandelter Ratten kommt es zwar zu einer deutlichen ($2\,p < 0{,}02$ nach 3 Std., $2\,p < 0{,}05$ nach 7,5 Std.) Herabsetzung der Syntheserate nach Stimulation mit 1 µg/ml hCG (Tab. 3), aber dabei wird auch zwangsläufig der pH des Inkubationsmediums nach ca. 7,1 verschoben, weil STR in Citratpuffer, pH 4,5, gelöst appliziert werden muß. Eine dementsprechende pH-Verschiebung in vitro, die durch Zusatz von Citratpuffer allein induziert wird, reduziert aber ebenfalls signifikant die Testosteronproduktion der Leydig-Zellen auf dieselbe Höhe wie Puffer plus STR (Tab. 3). Noch stärkere Ansäuerung des Inkubationsmediums - pH 6,3 - durch Citratpuffer vermindert die Syntheseleistung in Gegenwart von 1 µg/ml hCG derart, daß die Werte auf die Höhe der Basalproduktion unbehandelter Leydig-Zellen bei physiologischem pH absinken.

Angesichts der Abflachung, die man im Verlauf der Testosteronsynthesekurve unbehandelter Ratten (Abb. 3 a) nach 3 Std. beobachten kann, stellt sich weiter die Frage, ob die Fähigkeit zur Testosteronsynthese an die strukturell intakte Leydig-Zelle gebunden ist und ob, wenn dies der Fall ist, die Leydig-Zellen während der Inkubationszeit von 7,5 Std. funktionstüchtig bleiben. Um dieser Frage nachzugehen,

werden Leydig-Zellen normaler Ratten nach einer halbstündigen Vorinkubation mit 1 µg/ml hCG - um eine Bindung des Proteohormons an den Rezeptor zu ermöglichen - eine Minute mit Ultraschall bzw. mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator behandelt und danach in der üblichen Weise weiterinkubiert. Ultraschall bewirkt, wie durch Zellzählung nach der Homogenisierung feststellbar ist, Zerstörung aller Zellen, während nach Einwirkung des Potter-Elvehjem-Homogenisators noch ca. 2o - 25 % der Leydig-Zellen nachweisbar sind. In beiden Homogenaten findet noch eine Testosteronsynthese statt (Tab. 4), die aber signifikant unter den Produktionsraten intakter Zellen nach entsprechender Stimulation liegt ($2\ p < o{,}oo1$ ab 2 Std. nach Inkubationsbeginn). Dabei liegt die Syntheserate der durch Ultraschall erzeugten Homogenate sowohl basal als auch nach Stimulation mit hCG in Höhe der Basalproduktion intakter Zellen; die Testosteronproduktion der zellfreien Suspension nach Einwirkung des Potter-Elvehjem-Homogenisators liegt - auch nach Abzug des Anteils der intakten Zellen an der Produktion - deutlich höher, was auf eine weniger massive Zerstörung der für die Steroidsynthese verantwortlichen Zellorganellen hindeutet.

Für die oben angesprochene Abflachung der Testosteronsynthesekurve normaler Ratten nach 3 Std. Inkubationsdauer können wir nach einem weiteren Kontrollversuch den Abbau des Testosterons zu nicht mit dem RIA erfaßbaren Substanzen verantwortlich machen. Bei Inkubation von Leydig-Zellen nichtdiabetischer Ratten zeigt sich im Verlauf von 7,5 Std. ein deutlicher Abbau von 5o ng initial zugesetztem Testosteron, erfaßbar an der Abnahme der Radioakti-

vität eines zugesetzten Markers (^{3}H-Testosteron), sowohl nach Stimulation als auch ohne Zusatz von hCG (Abb. 5,oben). Mißt man stattdessen radioimmunologisch die Testosteronspiegel im Ansatz während 7,5 stündiger Inkubation und gibt die jeweilige Differenz zu den primär vorhandenen 5o ng Testosteron an, so ergibt sich ein Kurvenverlauf wie in Abb. 5(unten)dargestellt:

Bei fehlender Stimulation kommt es in gleicher Weise zu einer deutlichen, sich allmählich abflachenden Abnahme der Testosteronspiegel; unter hCG-Zusatz hingegen erfolgt - nach einem initialen Absinken der Spiegel, weil die hCG-Wirkung erst etwa nach 1 Stunde voll einsetzt - ein annähernd linearer Anstieg bis zum Ende der Inkubation, entsprechend einer kontinuierlichen Synthese.

Um den durch den Diabetes bewirkten Defekt in der Testosteronsynthese genauer zu lokalisieren, wird zunächst statt hCG zur in vitro-Stimulation der Leydig-Zellen Dibutyryl-cAMP in variierenden Dosen zugesetzt und damit das hCG/LH-Rezeptor/Adenylatcyclase-System umgegangen. Nach dreistündiger Inkubation beobachtet man hochsignifikante Unterschiede zwischen den diabetischen Ratten (6 Wochen nach STR-Applikation) und den Kontrolltieren (Abb. 6). Die Dibutyryl-cAMP-Konzentration, bei der halbmaximale Stimulation erreicht wird, ist zwar in beiden Fällen ähnlich - ca. $2 \times 1o^{-4}$ mol/l -, eine Konzentration von $2 \times 1o^{-3}$ mol/l, bei der jeweils ein maximaler stimulierender Effekt beobachtet wird, bewirkt aber bei den Kontrollen eine Syntheserate, die 4,3fach höher liegt als bei den diabetischen Tieren. Damit scheint die Auswirkung

des Diabetes auf die Stimulierbarkeit von Leydig-Zellen hier sogar noch etwas deutlicher hervorzutreten als bei Stimulation mit 1 µg/ml hCG, denn dort produzieren Leydig-Zellen von Ratten 6 Wochen nach STR-Gabe um einen Faktor 2,8 weniger Testosteron als Zellen von Kontrolltieren. Der Unterschied in den Faktoren ist allerdings nicht signifikant.

Da das hCG-Rezeptor/Adenylatcyclase-System offenbar nicht oder zumindest nicht allein für die verminderte Testosteronsynthese verantwortlich ist, haben wir im weiteren versucht, einen Defekt in der Steroidsynthese zum Testosteron aufzudecken. Die Messung des Cholesterinumsatzes in den Leydig-Zellen stößt auf erhebliche Schwierigkeiten, da der intrazelluläre Cholesterinpool sehr hoch ist und zugesetztes 4-^{14}C-Cholesterin zu weniger als 2 % in den Stoffwechsel eingeschleust wird. Daher werden nur die in der Testosteronsynthese später erscheinenden Metabolite Pregnenolon und Progesteron als Ausgangssubstanz für die quantitativen Untersuchungen des Syntheseverlaufs verwendet.

Nach Zusatz von 46o pMol ^{14}C-markiertem Pregnenolon bzw. 75o pMol ^{14}C-Progesteron zu Leydig-Zell-Suspensionen und Inkubation über 7,5 Stunden wird die Verteilung des Tracers in den einzelnen Metabolit-Fraktionen nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung gemessen. Die massenspektrographische Analytik der Metabolite ergibt, daß die Testosteronsynthese in Rattenhoden über die Stufen Pregnenolon - Progesteron - 17α-OH-Progesteron - Androstendion - Testosteron, also über den Δ4-Weg abläuft. 17α-OH-Pregnenolon und DHEA als die Indikatoren des

Δ^5-Weges können nicht identifiziert werden.

75o pMol Progesteron werden von Leydig-Zellen sechs Wochen diabetischer Tiere deutlich langsamer umgesetzt als in den Kontrollversuchen (Abb. 7 - 8). Die Verzögerung beginnt schon bei der Hydroxylierungsreaktion vom Progesteron zum 17α-OH-Progesteron. Während bei den Kontrollen die höchsten Aktivitäten in der 17α-OH-Progesteron-Fraktion bereits nach 15 Minuten auftreten, erreichen die Leydig-Zellen der diabetischen Tiere ein solches Maximum erst nach 1 Stunde; zu diesem Zeitpunkt ist bei den Normaltieren schon die Konzentration von Androstendion am höchsten, während dies bei den diabetischen Tieren erst nach 7,5 Stunden der Fall ist. Testosteron erreicht seine höchsten Spiegel im Inkubationsmedium bei den Kontrollen nach 3 Stunden und fällt danach allmählich wieder ab, bei den diabetischen Tieren verläuft die Syntheserate noch bis 7,5 Stunden linear. Dem entspricht auch, daß die Summe der übrigen Substanzen, die sich autoradiographisch nach DC-Trennung erfassen lassen, aber nur zum Teil identifiziert worden sind - 7α OH-Testosteron und 6β OH-Testosteron - bei den Kontrollen nach 7,5 Stunden etwa 3,7fach höher ist als bei den diabetischen Tieren.

Verwendet man als Tracer 46o pMol Pregnenolon, lassen sich im Gegensatz zum Progesteronmetabolismus keine Unterschiede in der Umsetzungsgeschwindigkeit zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Ratten aufzeigen (Abb. 9 - 1o). Die Verstoffwechslung verläuft weitgehend ähnlich ohne signifikante Differenzen. Pregnenolon wird allerdings nicht vollständig umgesetzt wie Progesteron. Es lassen sich bei den Kontrollen

nach 7,5 Stunden Inkubation immer noch 12,1 ± 5,o % (ohne hCG-Zusatz) bzw. 18,2 + 3,6 % Pregnenolon (mit hCG-Zusatz) nachweisen, während Progesteron in derselben Zeit zu mehr als 95 % (4,6 ± o,9 % bzw. 3,6 ± 1,2 %) umgesetzt wird. Die Konzentration der unter " übrige Fraktionen " subsumierten Testosteronabbauprodukte zeigt daher auch nach 7,5 Stunden deutlich niedrigere Werte als nach Verwendung von Progesteron als Präcursor. Eine Leydig-Zell-unabhängige, unspezifische Metabolisierung von Pregnenolon und Progesteron kann nach Inkubation der Tracer ohne Zusatz von Leydig-Zellen über 7,5 Stunden ausgeschlossen werden. Schließlich fällt auf, daß sich das Verteilungsmuster des Tracers bei Inkubationen in Abwesenheit von hCG nicht von dem nach Stimulation mit 1 µg/ml hCG unterscheidet, daß also offenbar hCG keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit des Präcursorumsatzes hat.

Es liegt nahe, das Ergebnis, daß Progesteron im diabetischen Tier langsamer als bei den Kontrollen, Pregnenolon aber unverändert verstoffwechselt wird, auf die Unterschiede in der Tracerdosis zurückzuführen. Die zur Abklärung dieser Fragestellung notwendige Untersuchung der Kapazitäten der testosteronsynthetisierenden Enzyme haben wir durch Versuche mit variierenden Dosen von Pregnenolon und Progesteron im Ansatz unternommen. Gemessen werden die Metabolisierungsraten der beiden Präcursoren nach 15 Minuten und 2 Stunden.

$2 \times 1o^5$ Leydig-Zellen 6 Wochen diabetischer Ratten setzen während 15-minütiger Inkubation geringere Mengen des Präcursors um als die der Kontrollen (Abb. 11). Dieser Effekt ist zwar im niedrigen Dosisbereich von

5o - 25o pMol auch schon erkennbar, aber nicht signifikant, während die Unterschiede im Bereich von 5oo - 25oo pMol hochsignifikant sind (2 $p < o,o1 - o,oo1$). Die Ergebnisse sind hierbei für beide Präcursoren ungefähr gleich. Innerhalb 2 Stunden Inkubationsdauer (Abb. 12) wird von den Kontrollen nicht wesentlich mehr verstoffwechselt als binnen 15 Minuten. Dies gilt vor allem für den niedrigen Dosisbereich von 5o - 25o pMol, da hier bereits nach 15 Minuten ca. 8o % des Tracers umgesetzt sind. Demgegenüber steht den Leydig-Zellen der diabetischen Tiere noch genügend Substrat zur weiteren Synthese zur Verfügung. Es treten daher nach der 2-stündigen Inkubation insgesamt bei den Präcursoren keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollen mehr auf.

5. TABELLEN

TABELLE 2

EFFEKT DES DIABETES MELLITUS AUF HODENGEWICHT, LEYDIG-ZELLZAHL UND SERUMTESTOSTERONSPIEGEL STREPTOZOTOZIN-DIABETISCHER RATTEN

Signifikanzen: § $\hat{=}$ 2 $p < 0{,}001$, & $\hat{=}$ 2 $p < 0{,}005$ (in Klammern n)

	Kontrollen	STR 3 Wochen	STR 6 Wochen
Testisgewicht (g/2 Testes)	3,06 ± 0,06 (22)	3,16 ± 0,12 (5)	3,08 ± 0,15 (12)
Leydig-Zellen (10^6/1 Hoden)	3,22 ± 0,29 & (6)		1,64 ± 0,2 & (6)
Testosteron (ng/ml Serum)	5,1 ± 0,3 § (9)		2,1 ± 0,2 § (4)

TABELLE 3 pH-EFFEKTE UND WIRKUNG DER IN-VITRO APPLIKATION VON STREPTOZOTOCIN AUF DIE hCG-STIMULIERTE TESTOSTERONSYNTHESE ISOLIERTER RATTEN-LEYDIG-ZELLEN

Inkubationsdauer		3o'	6o'	12o'	18o'	45o'
unstimulierte Kontrollen	pH 7,4 (15)	1,5 ±o,4	2,8 ±o,4	4,4 ±o,6	7,2 ±o,8	16,1 ± 2,4
Stimulation (1 µg hCG/ml)	pH 7,4 (15)	11,3 ±1,3	33,o ±3,7	85,4 ±8,o	123,8 ±8,9 +	163,5 ±12,6 x
	pH 7,1 (4)	9,4 ±o,9 §	18,3 ±1,6 §	45,4 ±3,6 §	58,2 ±5,4 § +	99,4 ±4,4 § x
	+ o,o5 mg/ml STR pH 7,1 (5)	9,8 ±1,2	2o,3 ±1,1	48,6 ±5,4	49,5 ±2,9 +	75,5 ±8,o x
	pH 6,3 (3)	2,2 ±o,2 §	2,4 ±o,2 §	3,6 ±o,6 §	7,5 ±1,6 §	11,8 ± 2,5 §

Produktionsraten in pMol/2 x $1o^5$ Zellen. Die Werte für Inkubationen mit Streptozotocin sind angegeben für pH 7,1 (pH-Verschiebung bei STR-Gabe aufgrund des obligaten Lösungsmittels Citratpuffer, pH 4,5). Zahl der Versuche in Klammern; Werte angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Signifikanzen (gleiche Zeichen bedeuten korrespondierende Werte): x ≙ 2 p < o,o5; + ≙ 2 p < o,o2; § ≙ 2 p < o,oo1

TABELLE 4

EFFEKT VON HOMOGENISIERUNG AUF DIE TESTOSTERONPRODUKTION VON ISOLIERTEN LEYDIG-ZELLEN

Inkubationsdauer			3o'	6o'	12o'	18o'	45o'
unstimulierte Kontrollen (Zellen)		(15)	1,5 ±o,4	2,8 ±o,4	4,4 ±o,6	7,2 ±o,8	16,1 ±2,4
hCG-Stimulierte	Kontrollen (Zellen)	(15)	11,3 ±1,3	33,o x ±3,7	85,4§ ±8,o	123,8§ ±8,9	163,5§ ±12,6
	Zellfreie Homogenate: Potter Elvehjem	(9)	7,7 ±2,1	16,o x ±5,1	25,1§ ±5,1x	39,8§ ±8,6+	66,6§ ±11,9§
	Zellfreie Homogenate: Ultraschall	(8)	2,8 ±o,5	3,5 ±o,6	7,1x ±2,1	9,3+ ±2,7	11,4§ ±2,9

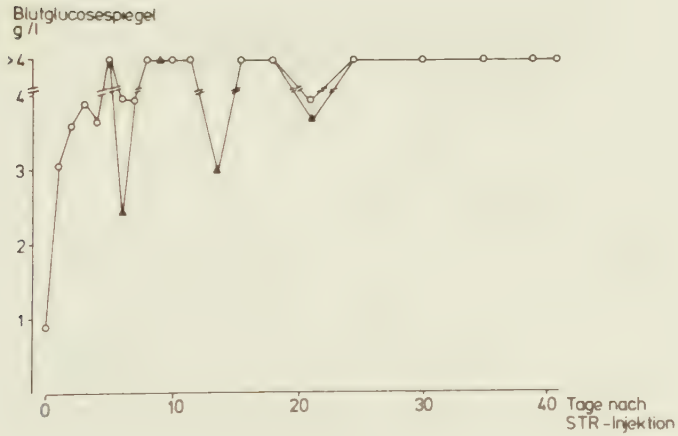
Produktionsraten in pMol/2 x $1o^5$ Zellen. Vor der Homogenisierung werden die Zellsuspensionen 3o Minuten in einem 1 µg/ml hCG enthaltenden Medium vorinkubiert. Die Testosteronsyntheseraten der zellfreien Potter-Elvehjem-Homogenate werden berechnet aus der totalen Testosteronsynthese abzüglich des Syntheseanteils der verbliebenen intakten Zellen (ca. 2o-25 % der Originalzellzahl). Signifikanzen (gleiche Zeichen bedeuten korrespondierende Werte): x ≙ 2 $p < o,o2$; + ≙ 2 $p < o,o1$; § ≙ 2 $p < o,oo1$. Zahl der Versuche in Klammern, Werte angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

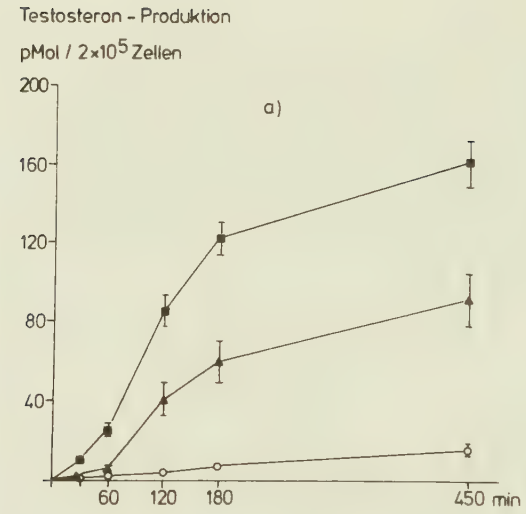
6. ABBILDUNGEN

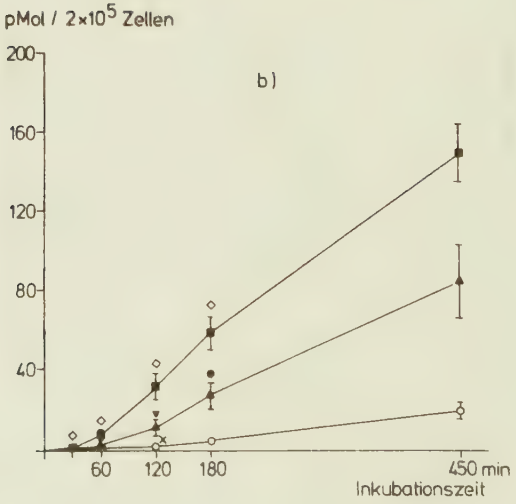
ABBILDUNG 2

BLUTGLUCOSESPIEGEL DER DIABETISCHEN VERSUCHSTIERE

Verlauf nach einmaliger Injektion von 1oo mg Streptozotocin/kg Körpergewicht über 6 Wochen, angegeben als Median $\tilde{x}$; alle $\tilde{x}$, die oberhalb des Meßbereichs des Reflektometers (4,o g/l) liegen, sind einheitlich als $\tilde{x} > 4{,}o$ g/l rubriziert.




Testosteron - Produktion
pMol / 2×10^5 Zellen
200
160
120
80
40
a)
60
120
180
450 min


pMol / 2×10^5 Zellen
200
160
120
80
40
b)
60
120
180
450 min
Inkubationszeit

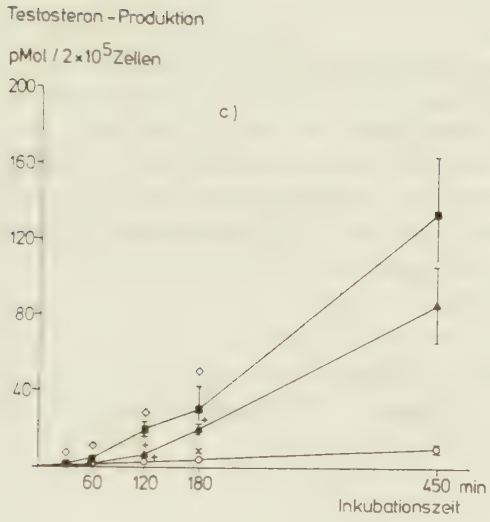


ABBILDUNG 3

STIMULATION DER TESTOSTERONSYNTHESE DURCH HCG

Zeitverlauf der Testosteronsynthese durch 2 x 10^5 Leydig-Zellen von nichtdiabetischen Kontrollen (a) und diabetischen Ratten 3 Wochen (b) bzw. 6 Wochen (c) nach Applikation von Streptozotocin. o—o ohne Stimulation, ▲-▲ Zusatz von 10^{-9} g hCG/ml Inkubationsmedium, ■-■ Stimulation mit 10^{-6} g hCG/ml. Werte angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n=15 in Abb. a, n=13 in b, n=11 in c). Signifikanzen gegenüber den entsprechenden Werten der Reihe a:
● ≙ 2 $p < 0{,}05$; × ≙ 2 $p < 0{,}02$; ▽ ≙ 2 $p < 0{,}01$;
+ ≙ 2 $p < 0{,}005$; ◇ ≙ 2 $p < 0{,}001$

ABBILDUNG 4

TESTOSTERONSYNTHESE PRO HODEN NACH HCG-STIMULATION

Synthese pro 2 x 10^5 Leydig-Zellen (linkes Bild) bzw. pro Hoden (rechtes Bild, Werte umgerechnet auf die Gesamtzahl an Leydig-Zellen in einem Hoden) im Verlauf von 45o Minuten bei nichtdiabetischen (●), 3 Wochen (▲) und 6 Wochen (■) diabetischen Ratten. Stimulation mit 10^{-6} g hCG/ml. Signifikanzen gegenüber den Kontrollen: x ≙ 2 $p < 0{,}001$

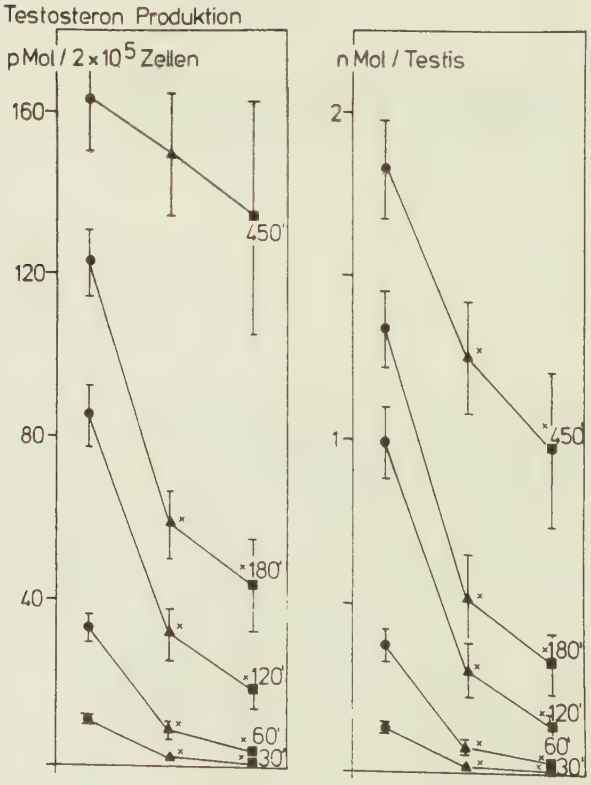


ABBILDUNG 5 (nächste Seite)

TESTOSTERONABBAU IN LEYDIG-ZELLEN

Abbau von 5o ng unmarkiertem Testosteron + 35ooo cpm ^{3}H-Testosteron durch 2 x $1o^{5}$ Leydig-Zellen normaler Ratten während 45o Minuten (oberes Bild); Werte angegeben als Differenz der ^{3}H-Aktivität in der dünnschichtchromatographisch isolierten Testosteronfraktion gegenüber dem eingesetzten Testosteron.

Unteres Bild: Zusatz von 5o ng unmarkiertem Testosteron zu 2 x $1o^{5}$ Leydig-Zellen normaler Ratten; Inkubation über 45o Minuten, Bestimmung der jeweiligen Testosteronspiegel mittels Radioimmunoassay, Werte angegeben als Differenz zur eingesetzten Testosterondosis.

o-o ohne Stimulation, ●-● Zusatz von $1o^{-6}$ g hCG/ml Inkubationsmedium; Mittelwerte aus jeweils n=2 Versuchen.

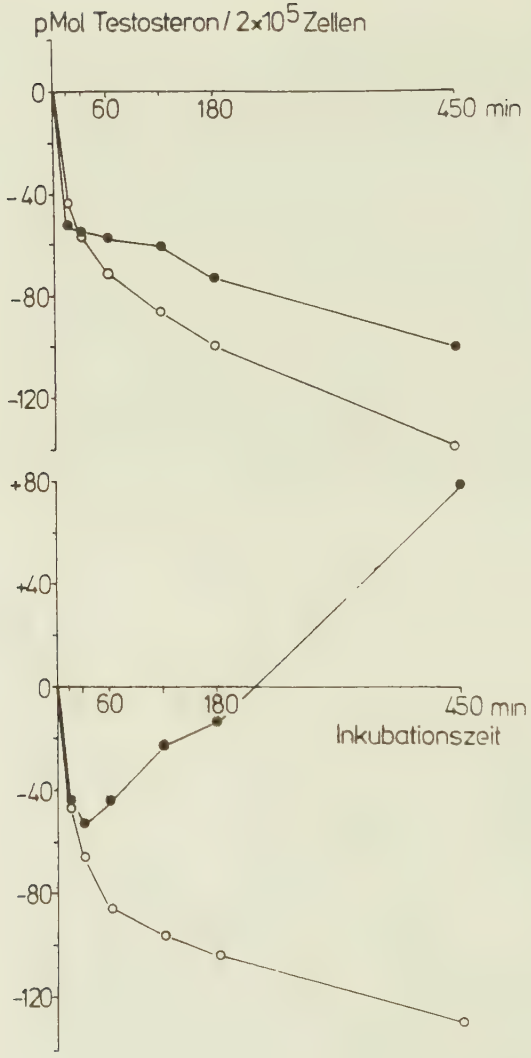
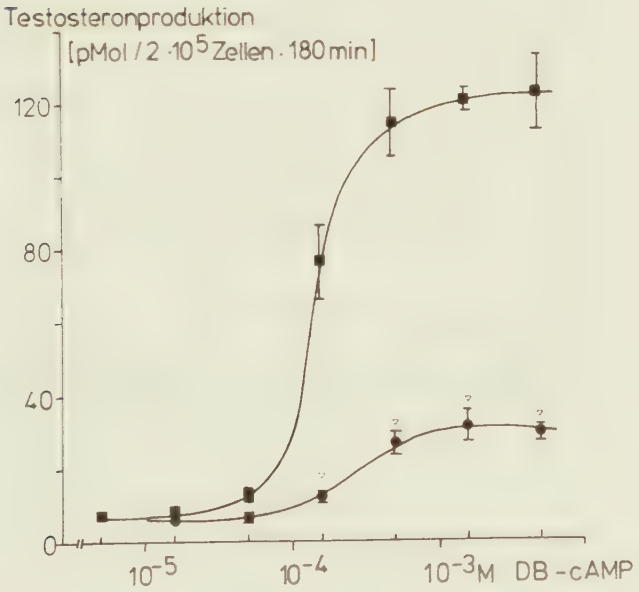
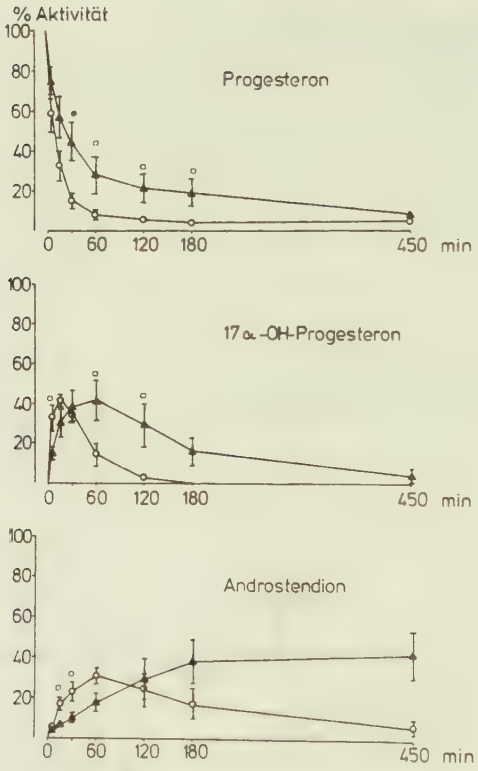

pMol Testosteron / 2×10⁵ Zellen
0
60
180
450 min
-40
-80
-120
+80
+40
0
60
180
450 min
Inkubationszeit
-40
-80
-120

ABBILDUNG 6

DOSIS-WIRKUNGSKURVE VON DIBUTYRYL-CAMP

Testosteronbildung durch Leydig-Zellen von nichtdiabetischen (▼-▼) und Streptozotocin-diabetischen (▽-▽) Ratten (6 Wochen nach Applikation)in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Dibutyryl-cAMP; Werte angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n=4 in jeder Reihe)
Signifikanzen gegenüber Kontrollen: ▽ ≙ 2 $p < 0{,}001$




% Aktivität
100
80
60
40
20
Progesteron
0
60
120
180
450
min
100
80
60
40
20
17α-OH-Progesteron
0
60
120
180
450
min
100
80
60
40
20
Androstendion
0
60
120
180
450
min

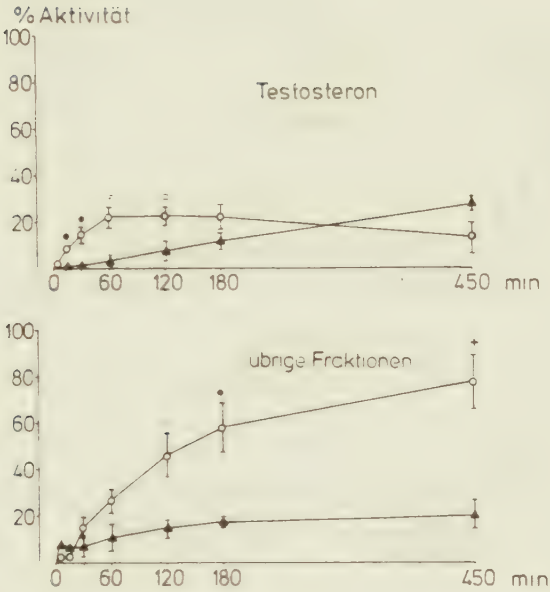
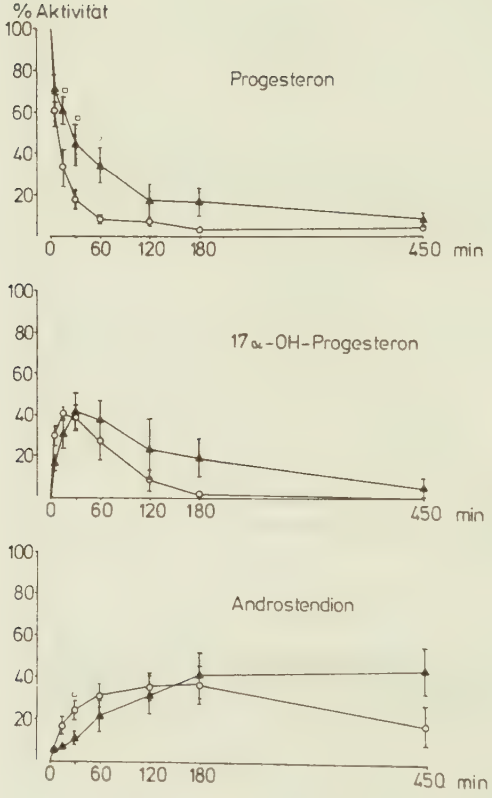


ABBILDUNG 7

METABOLISIERUNG VON ^{14}C-PROGESTERON IN LEYDIG-ZELLEN

Zeitverlauf des Umsatzes von 75o pMol 4-^{14}C-Progesteron in Leydig-Zellen (2 x $1o^5$/Ansatz) von normalen (O—O) und Streptozotocin-diabetischen (▲—▲) Ratten (6 Wochen nach Applikation). Kein Zusatz von hCG. Verteilung des Tracers in den einzelnen aufgeführten Steroidfraktionen; Werte angegeben in % der Gesamtaktivität als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n=7 bei den Kontrollen, n=5 bei den diabetischen Tieren). Signifikanzen gegenüber den Kontrollen: □ ≙ 2 $p < o,o5$; • ≙ 2 $p < o,o2$; ▽ ≙ 2 $p < o,o1$; + ≙ 2 $p < o,oo5$


% Aktivität
100
80
60
40
20
Progesteron
0
60
120
180
450 min
100
80
60
40
20
17α-OH-Progesteron
0
60
120
180
450 min
100
80
60
40
20
Androstendion
0
60
120
180
450 min

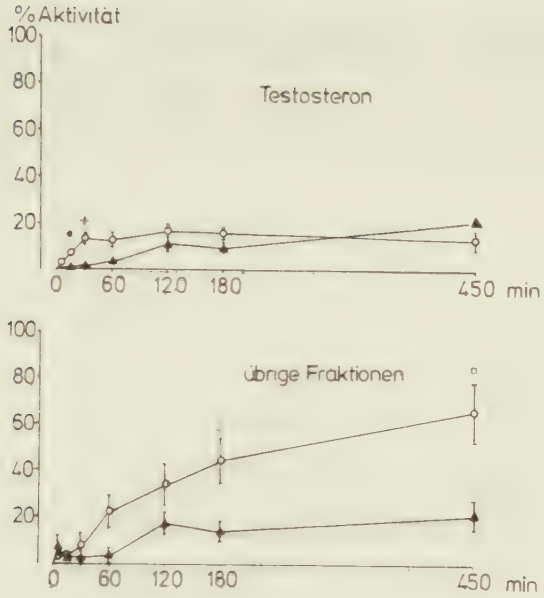


ABBILDUNG 8

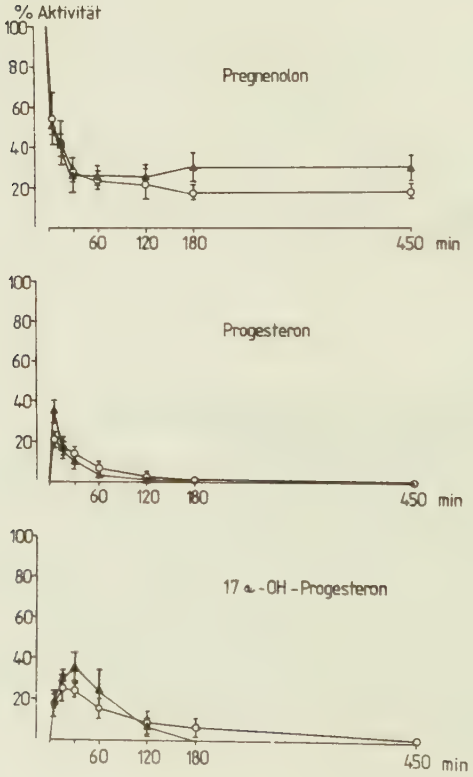
METABOLISIERUNG VON ^{14}C-PROGESTERON IN LEYDIG-ZELLEN NACH ZUSATZ VON HCG

Zeitverlauf des Umsatzes von 750 pMol 4-^{14}C-Progesteron in Leydig-Zellen (2 x 10^5/Ansatz) von normalen (O—O) und Streptozotocin-diabetischen (▲—▲) Ratten (6 Wochen nach Applikation) in Gegenwart von 10^{-6} g hCG/ml. Verteilung des Tracers in den einzelnen aufgeführten Steroidfraktionen; Werte angegeben in % der Gesamtaktivität als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n=7 bei den Kontrollen, n=5 bei den diabetischen Tieren). Signifikanzen gegenüber den Kontrollen: □ ≙ 2 $p < 0{,}05$; ● ≙ 2 $p < 0{,}02$; ▽ ≙ 2 $p < 0{,}01$; + ≙ 2 $p < 0{,}005$

ABBILDUNG 9

METABOLISIERUNG VON ^{14}C-PREGNENOLON IN LEYDIG-ZELLEN

Zeitverlauf des Umsatzes von 46o pMol 4-^{14}C-Pregnenolon in Leydig-Zellen (2 x 1o^{5}/Ansatz) von normalen (○—○) und Streptozotocin-diabetischen (▲—▲) Ratten (6 Wochen nach Applikation). Kein Zusatz von hCG. Verteilung des Tracers in



den einzelnen aufgeführten Steroidfraktionen; Werte angegeben in % der Gesamtaktivität als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n=7 bei den Kontrollen, n=5 bei den diabetischen Tieren). Keine signifikanten Differenzen zwischen diabetischen und Kontrolltieren.

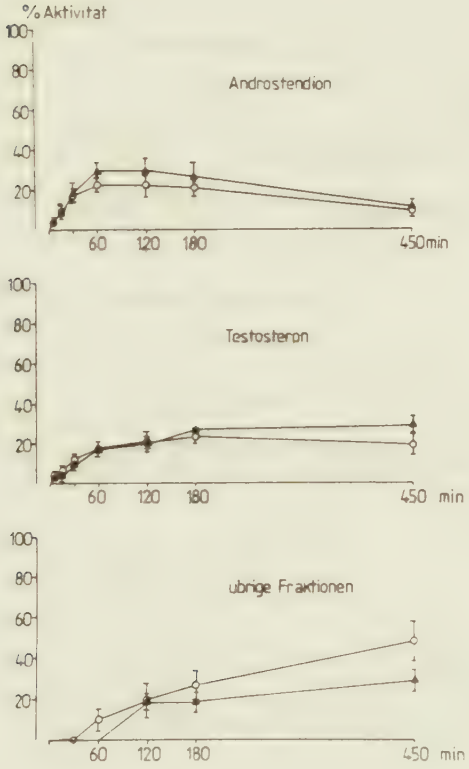
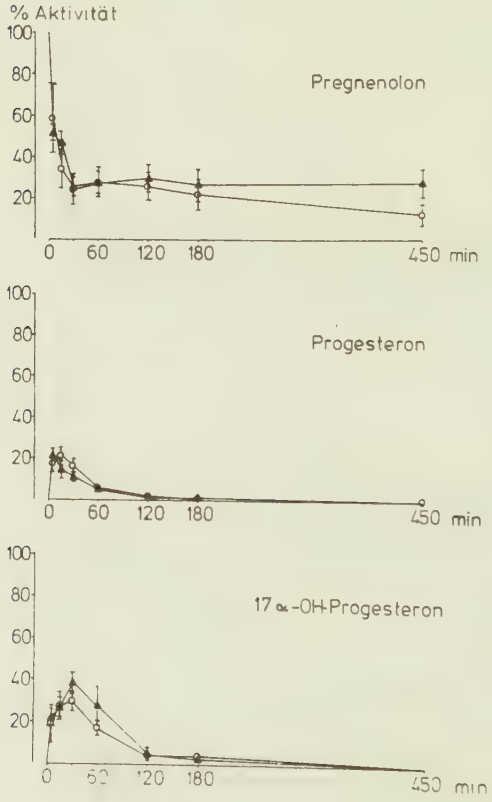


ABBILDUNG 1o

METABOLISIERUNG VON ^{14}C-PREGNENOLON IN LEYDIG-ZELLEN NACH ZUSATZ VON HCG

Zeitverlauf des Umsatzes von 46o pMol 4-^{14}C-Pregnenolon in Leydig-Zellen (2 x 1o^{5}/Ansatz) von normalen (O—O) und Streptozotocin-diabetischen (▲—▲) Ratten (6 Wochen nach



Applikation) in Gegenwart von 10^{-6} g hCG/ml. Verteilung des Tracers in den einzelnen aufgeführten Steroidfraktionen; Werte angegeben in % der Gesamtaktivität als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n=7 bei den Kontrollen, n=5 bei den diabetischen Tieren). Keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und diabetischen Tieren.

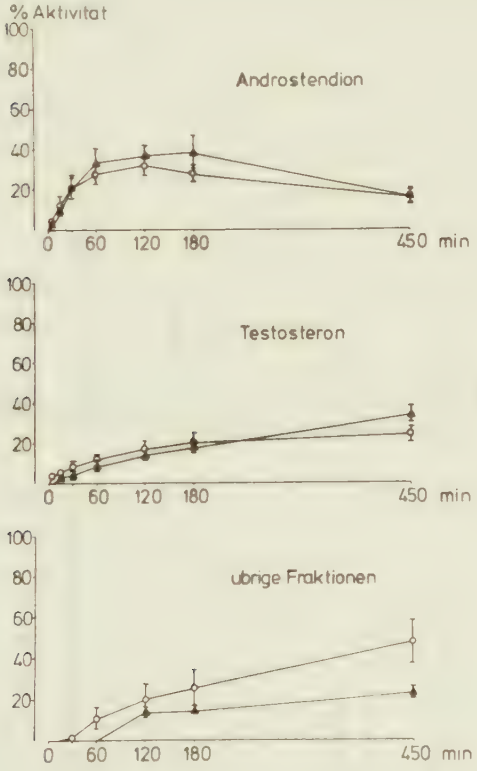


ABBILDUNG 11

METABOLISIERUNG VON ^{14}C-PROGESTERON IN LEYDIG-ZELLEN

Umsatz verschiedener Konzentrationen von 4-^{14}C-Progesteron durch 2 x 10^5 Leydig-Zellen von diabetischen Ratten 6 Wochen nach Streptozotocingabe (helle Säulen) und Kontrollen (dunkle Säulen) binnen 15 Minuten (oberes Bild) und 120 Minuten (unteres Bild); keine hCG-Zugabe. Werte angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n=5 in jeder Versuchsgruppe) Signifikanzen: ○ ≙ 2 $p < 0{,}001$; □ ≙ 2 $p < 0{,}005$

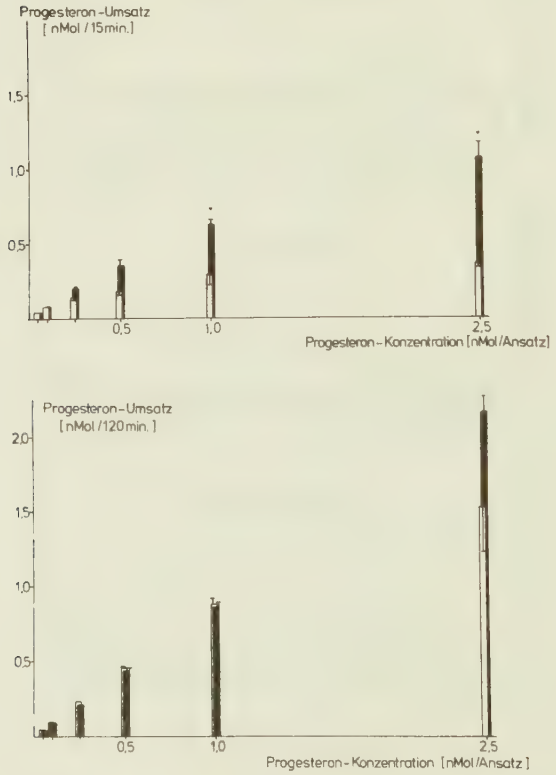
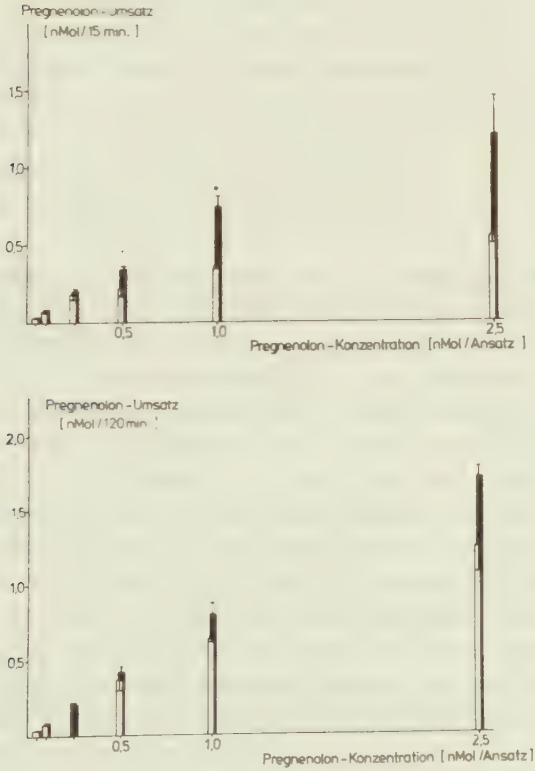


ABBILDUNG 12

METABOLISIERUNG VON ^{14}C-PREGNENOLON IN LEYDIG-ZELLEN

Umsatz verschiedener Konzentrationen von 4-^{14}C-Pregnenolon durch 2 x 10^5 Leydig-Zellen von diabetischen Ratten 6 Wochen nach Streptozotocingabe (helle Säulen) und Kontrollen (dunkle Säulen) binnen 15 Minuten (oberes Bild) und 120 Minuten (unteres Bild); kein hCG-Zusatz. Werte angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n=5 in jeder Versuchsgruppe)
Signifikanzen: $\Delta \triangleq 2\ p < 0{,}02$; $\bullet \triangleq 2\ p < 0{,}001$



7. DISKUSSION

7.1 Zur Methodik

Als experimentelles Modell zum Studium der Wirkung des Diabetes mellitus auf die männlichen Gonaden haben wir bei unseren Untersuchungen adulte Albinoratten verwendet, denen zur Induktion dieser generalisierten Stoffwechselstörung Streptozotozin in einer Dosis von 1oo mg/kg Körpergewicht intraperitoneal 3 bzw. 6 Wochen vor dem Versuch appliziert wird. Die hohe β-Cytotoxizität dieser Substanz (11) führt bei 97,5 % unserer Tiere zu einem schnellen Auftreten hoher Blutglucosespiegel (> 3oo mg/dl) bereits 24 Stunden nach der Verabreichung. Die Manifestationsrate liegt damit wesentlich höher als von Paz et al. (5) beschrieben, die nach Injektion von 5o mg STR/kg KG in die Femoralvene bei adulten Ratten sowie von 15o mg/kg KG bei juvenilen Ratten lediglich in 42 % bzw. in 59,5 % ein Auftreten des Diabetes mellitus beobachten. Ein zweiter Vorteil unserer Applikationsform ist die im Vergleich zur Literatur (Tab. 5) verhältnismäßig niedrige Mortalitätsrate von 3/4o (7,5 %). Dies beruht wahrscheinlich nicht auf Unterschieden im Ausmaß der Hyperglykämie, denn die von uns gemessenen Blutglucosespiegel entsprechen durchaus denen der Literatur (5, 8, 16) und fallen auch nach 24-stündigem Fasten nicht stark ab. Vielmehr können nicht auf Diabetesfolgen beruhende, unspezifische Nebenwirkungen des STR, die bei der i.v.-Applikation aufgrund anderer Pharmakokinetik eher als bei der i.p.-Applikation zum Tragen kommen könnten, eine wesentliche Rolle spielen. Immerhin soll auch die i.v.-Applikation von STR noch geringere

TABELLE 5

Mortalität von Ratten nach Gaben von Streptozotozin oder Alloxan in der neueren Literatur

Autoren	Substanz in mg/kg KG, Art der Ratten, Applikationsform, Versuchsdauer (Tage)	Mortalität
Oksanen (4)	STR 75 mg adulte Ratten i.v. 13o d	13 %
Paz et al. (5)	STR 5o mg adulte Ratten i.v. 5o d	1o %
"	STR 15o mg juvenile Ratten i.v. 12o d	58 %
Howland et al.	STR 65 - 7o mg adulte Ratten i.v. 21 d	16 %
(8) "	Alloxan 15o mg adulte Ratten i.v. 21 d	67 %
Hunt et al. (9)	Alloxan 25o - 35o mg juvenile Ratten i.v. 23 - 38 d	33 %

Nebenwirkungen zeigen - bei zugleich größerer Wirksamkeit als diabetogenes Agens - als die Gabe von Alloxan (5, 8), denn bei Anwendung dieser Substanz hat man - trotz niedrigerer Blutzuckerwerte (8) - hohe Mortalitätsraten von 67 % (8) bei adulten und 33 % bei unreifen Ratten (9) beobachtet.

Die Ratten werden zum Versuch deswegen nicht mit einer Überdosis Äther getötet, um dessen von Hauger et al. (32) entdeckte kurzfristig stimulierende Wirkung auf die Gonadotropin- und nachfolgend Testosteronsekretion zu vermeiden, was zu erheblichen Verfälschungen der "Basalwerte" bei unseren Inkubationen geführt hätte. Statt dessen werden die Tiere durch einen Nackenschlag getötet und die Testes sofort entnommen und entkapselt.

Da die Leydig-Zelle nicht der einzige Zelltyp im Hoden ist, der zur Synthese von Testosteron aus Präcursoren wie Progesteron befähigt ist (13), wenn auch der einzige Zelltyp, in dem physiologisch relevant LH/cAMP-gesteuerte Testosteronsynthese abläuft (15), ist es erforderlich, die Leydig-Zellen zu isolieren und anzureichern, um unkontrollierbare Einflüsse der anderen Zellsysteme hinsichtlich Androgensynthese und -abbau weitgehend zu eliminieren.

Zur Isolierung der Leydig-Zellen aus dem Hodengewebe werden die Testes mit Collagenase, wie von Dufau et al. (2o) angegeben, inkubiert; die etwas längere Einwirkungsdauer von 2o Minuten führt zu einer gründlicheren Zersetzung des interstitiellen Fasergerüstes und die Tubuli lassen sich nachfolgend besser herausfiltrieren. Das Verfahren ist wesentlich weniger zeitaufwendig und auch schonender als das von (13) und vereinfachend modifiziert von (14) angegebene Verfahren der mechanischen Trennung von Tubuli und Interstitium mittels zweier Pinzetten (sog. wet dissection technique, vgl. auch 2o, 21). Dufau et al. (32) stellen bei der wet dissection Technik einen nahezu vollständigen Verlust der LH-Sensitivität des interstitiellen Gewebes heraus, wohingegen mit Collagenase isolierte Leydig-Zellen schon auf niedrige Konzentrationen von LH oder hCG deutlich reagieren (2o). Es wird allerdings auch von manchmal auftretenden Sensitivitätsverlusten Collagenase-isolierter Leydig-Zellen gegenüber hCG berichtet (2o), wofür unterschiedliche Verunreinigungen einzelner Collagenasechargen mit anderen, eventuell die Gonadotropinrezeptoren abdauenden proteolytischen Enzymen verantwortlich gemacht werden. Ein entscheidender Vorteil der enzymatischen

Isolierung liegt aber darin, daß eine Kontrolle der Zellzahl nach Anfärbung mit enzymcytochemischen Methoden (21, 27 - 3o) in der Zählkammer möglich ist; dies läßt neben einer exakten Standardisierung der Zellzahlen für die Versuchsansätze die genaue Quantifizierung metabolischer Parameter für die einzelne Zelle zu.

Nach Einwirkung der Collagenase und Herausfiltrierung der Tubuli aus dem so aufgelösten Gewebe erhalten wir Suspensionen, die bei einer Gesamtzahl von $4,4 \times 1o^7$ Zellen/Hoden im Mittel 1o,2 % Leydig-Zellen enthalten. Demgegenüber zählen Janszen et al. (22) 6 % Leydig-Zellen in einer entsprechend gewonnenen Suspension und Browning et al. (25) 1o %, wobei nicht nur die relativen, sondern auch die absoluten Zellzahlen mit unseren Werten sehr gut übereinstimmen. Moger (34) und Sharpe et al. (35) erhalten 25 % bzw. 3o % nach Collagenaseinkubation der Testes und Dufau et al. (2o) geben sogar 5o % an. Diese Ergebnisse erscheinen allerdings insbesondere angesichts der Tatsache recht unwahrscheinlich, daß gerade die Arbeitsgruppe Dufau in einer späteren Publikation (23) nur noch von 12 - 15 % berichtet.

Zur Anreicherung der Leydig-Zellen aus der nach Collagenaseinkubation erhaltenen "unreinen" Suspension verwenden wir die Dichtegradientenzentrifugation durch einen zweistufigen Percoll^R-Gradienten, unter Zusatz von Rinderserumalbumin entsprechend (22 - 24): dieser Zusatz steigert den durch die Gradientenzentrifugation erreichbaren Anreicherungsgrad (22) und scheint nach unseren Erfahrungen auch bei cytochemischer Darstellung der 3β ol-Dehydrogenase-Aktivität

in den Zellen nach dem Zentrifugationsschritt die Zahl gut anfärbbarer, d.h. intakter Zellen gegenüber Percoll-Medien ohne entsprechenden Albuminzusatz zu erhöhen. Bereits Schumacher et al. (24) haben Percoll für lineare Gradienten zur Anreicherung von Maus-Leydig-Zellen verwendet. Nach dem Zentrifugationsschritt zählen sie 9o - 94 % Leydig-Zellen in ihren Inkubationsansätzen. Den gleichen Wert erreichen Browning et al. (25) mit ähnlich aufgebauten Percoll-Gradienten auch bei der Anreicherung von Ratten-Leydig-Zellen. Der Vorteil unseres Verfahrens liegt demgegenüber darin, daß wir (abgesehen von der rascheren und ohne automatischen Gradientenformer manuell durchführbaren Gradientenherstellung) bei einem nur geringfügig niedrigeren Anreicherungsgrad von 87,7 % von den ursprünglich 4,5 x $1o^6$ auf den Gradienten aufgetragenen Leydig-Zellen immerhin noch 68 % nach der Anreicherung zurückerhalten. Browning et al. (25) dagegen konstatieren, daß ihre hochangereicherte Leydig-Zell-Fraktion nur noch 1,5 - 2 % der ursprünglich vorhandenen Leydig-Zellen repräsentiert.

29 % Ausbeute und eine Anreicherung auf 6o % erreichen Janszen et al. (22) mit Ficoll-Gradienten. Conn et al. (23) kommen auf ähnliche Werte von 63 - 7o % mit Ficoll, beschreiben aber störende Verunreinigungen mit Erythrozyten. Höhere Anreicherung auf 9o - 94 % läßt sich auch mit kontinuierlichen Metrizamid-Gradienten erzielen (23); das Verfahren wird aber von den Autoren selbst als aufwendig und teuer beurteilt und ist eine Zeitlang umstritten gewesen, denn Schumacher et al. (24) haben bei Mäusen eine schädigende Wirkung des Metrizamid auf die Leydig-Zellen beobachten können. Ein entsprechender Effekt auf

Ratten-Leydig-Zellen existiert aber laut Payne et al. (36) offenbar nicht.

Die Inkubationen werden nach Dufau et al. (33) bei 34 ^{o}C durchgeführt, da dies nach deren Angaben und unseren eigenen Vorversuchen die optimale Inkubationstemperatur für Leydig-Zellen zu sein scheint. Pro Ansatz werden einheitlich 2 x $1o^{5}$ Zellen in einem Volumen von o,4 ml eingesetzt. Dies entspricht in etwa der Zellkonzentration, bei der nach Moger (34) die Stimulierbarkeit der Testosteronsynthese durch hCG pro Zelle am höchsten ist. Bei höheren Zellzahlen scheint die Nettosyntheseleistung pro Zelle abzusinken, bei niedrigeren Zellzahlen pro Ansatz wird der Meßfehler bei den entsprechend niedriger liegenden Testosteronwerten relativ zu groß. Standardisierte Zellzahlen sind im übrigen natürlich auch erforderlich, um den Umsatz von Präcursor und Metaboliten präzise vergleichen zu können. Deshalb sind Vergleiche mit entsprechenden Angaben aus der Literatur wegen stark differierender Zellzahlen und unterschiedlicher Reinheitsgrade der Leydig-Zell-Suspensionen kaum möglich.

Im allgemeinen ist die Dauer der Inkubationen auf 7,5 Stunden ausgedehnt, um den zeitlichen Ablauf der Testosteronsynthese unter hCG-Stimulation möglichst umfassend überblicken zu können. Während Dufau et al. (2o) die Schädigung und Zerstörung der Leydig-Zellen lediglich bis zu einer Inkubationsdauer von 4 Stunden für vernachlässigbar halten, können wir beobachten, daß eine hinreichende Integrität der Leydig-Zellen über die gesamten 7,5 Stunden hinweg gewährleistet ist. Zwar sind auch zerstörte Zellen bzw. Zellfrag-

mente - speziell die Mikrosomen - in gewissem Umfang zur Testosteronsynthese fähig, was sich in unseren Inkubationen mit homogenisierten Leydig-Zellen nachweisen läßt, jedoch erzeugen diese Zellhomogenate nach hCG-Stimulation wesentlich weniger Testosteron als intakte Zellen. Würde nach mehr als 4 Stunden ein Großteil der Zellen durch Zerstörung nicht mehr zur hCG-stimulierten Testosteronsynthese beitragen können, sondern nur noch eine Restproduktion in einem Ausmaß wie die homogenisierten Zellen zeigen, müßte das in der Synthesekurve (Abb. 3 a - c) bei maximaler Stimulation mit 1 µg hCG/ml Medium eine deutliche Abflachung jenseits des 3 Stunden-Meßwertes ergeben. Eine solche Abflachung gibt es aber bei den 3 und 6 Wochen diabetischen Leydig-Zellen überhaupt nicht (Abb. 3 b + c); vielmehr findet man sogar einen maximalen Anstieg der Testosteronproduktion. Das wäre mit defekten Zellen, d.h. mit Zellen, bei denen es zu einer Entkopplung des membranständigen Rezeptor/Adenylatcyclase-Systems und der in Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum stattfindenden Steroidsynthese gekommen ist, kaum möglich, und es ist sehr unwahrscheinlich, daß ausgerechnet diabetische Leydig-Zellen sich bei Langzeitinkubation als resistenter erweisen sollten als Leydig-Zellen nichtdiabetischer Ratten. Das allmähliche Abflachen der Synthesekurve in Abb. 3 a wiederum können wir auf einen vermehrten Abbau des Testosterons durch die Leydig-Zellen zurückführen. Wie aus Abb. 5 zu ersehen ist, zeigen Leydig-Zellen bei hohen Testosteronspiegeln die Eigenschaft, das Hormon wieder zu diversen Metaboliten weiterzuverstoffwechseln bzw. abzubauen. Die Mindestkonzentration, bei der ein Abbau des Hormons in nennenswertem Ausmaß zu Tage tritt, ist für die nicht vom Diabetes

betroffenen Leydig-Zellen etwa nach 3 Stunden erreicht, daher flacht die Synthesekurve ab (Abb. 3 a). Bei den diabetesgeschädigten Leydig-Zellen treten derartig hohe Konzentrationen offenbar gar nicht oder erst gegen Ende der Inkubation auf, so daß sich keine Konsequenzen mehr für den Kurvenverlauf in Abb. 3 b und c ergeben.

Korrigiert man die Nettosynthese an Testosteron aus Abb. 3 a um diesen Abbau, erhält man als tatsächliche Neuproduktion einen annähernd linearen Syntheseverlauf; dies kann man ebenfalls als Argument für die Intaktheit der Leydig-Zellen über die gesamte Inkubationsdauer von 7,5 Stunden hinweg werten. Ansonsten dürfte der Abbau in vivo keine große Rolle spielen, da er offensichtlich erst durch den mangelnden Abtransport des Hormons in vitro und die daraus resultierende Akkumulation in der direkten Umgebung der Leydig-Zellen zum Tragen kommt. Es könnte sich dabei um eine Art Selbstschutzmechanismus der interstitiellen Zelle gegen das Auftreten extrem hoher Testosteronspiegel handeln.

Ein direkter toxischer Effekt von STR auf Leydig-Zellen kann nach weiteren Kontrollversuchen ausgeschlossen werden, bei denen die Syntheseleistung von Leydig-Zellen nichtdiabetischer Ratten nach Zusatz von STR zum Inkubationsansatz ohne und nach Stimulation mit hCG gemessen wird (Tab. 3). Die basale Testosteronsynthese wird durch STR überhaupt nicht beeinträchtigt, die Testosteronsynthese unter hCG-Stimulation erscheint gegenüber den Kontrollen lediglich ab 3 Stunden Inkubationsdauer vermindert; keine Verminderung jedoch besteht gegenüber Kontrollen mit

entsprechendem pH des Inkubationsmediums: STR wird in Citratpuffer, pH 4,5, gelöst appliziert, was zu einer Ansäuerung des Mediums auf pH 7,1 führt. Eine unmittelbare Schädigung durch STR ist danach als sehr unwahrscheinlich oder höchstens geringfügig anzusehen. Ein weiteres Argument gegen toxische Direktwirkung auf Leydig-Zellen liefert die Feststellung, daß 6 Wochen nach Applikation der Substanz wesentlich ausgeprägtere Schädigungen der endokrinen Testisfunktionen vorliegen als nach 3 Wochen, obwohl die STR-Dosis in allen Fällen gleich ist und obwohl die Substanz relativ schnell eliminiert wird: bei Mäusen sind nach 2o Stunden nur noch Spuren nachweisbar und Hunde bauen 5 mg STR/Minute in der Leber ab (11). Dies spricht viel eher für primäre oder sekundäre - in Form von hypophysären oder neurologischen Störungen - Folgen des Diabetes mellitus als für unmittelbare STR-Toxizität. Im übrigen hat auch Oksanen (4) keine frühen morphologischen Schäden beobachten können, die man auf direkte STR-Toxizität zurückführen müßte. Also kann man die im weiteren zu besprechenden pathophysiologischen Phänomene des STR-Diabetes tatsächlich als Begleiterscheinungen bzw. Folgen dieser Stoffwechselerkrankung diskutieren.

7.2 Rahmenparameter

Bei unseren Untersuchungen haben wir zwei wesentliche Auswirkungen eines STR-Diabetes auf das endokrine System des Hodens der Ratte aufdecken können:

a) Eine Reduktion der Ausbeute an Leydig-Zellen pro Testis mit unserem Isolierungsverfahren sowie

b) eine verminderte Testosteronantwort der Leydig-Zellen auf hCG in vitro und eine deutlich verminderte Testosteronbildung aus Präcursoren der Androgenbiosynthese,

wobei beide Faktoren in vivo durch ihr multiplikatives Zusammenwirken eine besonders deutliche Schädigung der endokrinen Testisfunktion als Folge des Diabetes mellitus bewirken könnten. Einen gewissen Anhaltspunkt hierfür geben die Serumtestosteronspiegel. Wir haben bei unseren Versuchstieren eine Verminderung freien zirkulierenden Hormons auf 4o % gegenüber nichtdiabetischen Kontrollen feststellen können. Howland et al. (8) und Tesone et al. (16) beobachten eine ähnlich ausgeprägte Reduktion (auf 54 % bzw. 44 %), Paz et al. (5, 37) geben sogar eine Verminderung auf 17 % der Kontrollwerte an. Die Absolutwerte liegen zwischen o,38 $\pm$ o,15 (5) und 2,o $\pm$ o,42 ng/ml (8) - dies gilt für die diabetischen Tiere - bzw. zwischen 1,87 (16) und 3,7 ng/ml (8) bei den Kontrolltieren und damit etwas niedriger als unsere Werte von 2,1 ng/ml vs. 5,1 ng/ml Testosteron. Als Ursache solcher Unterschiede spielen sicherlich Art der Induktion des Diabetes (STR-Dosis, Applikationsweg), Alter der Versuchstiere, Dauer des Bestehens der diabetischen Stoffwechsellage, Zeitpunkt und Konditionen der Messung (Ätheranästhesie bei 8) sowie natürlich auch Probenentnahme und -aufbereitung eine Rolle.

Die von manchen Autoren festgestellte mehr oder weniger deutliche Reduktion des Testisgewichtes STR-diabetischer Ratten (8, 17, 38) haben wir in Übereinstimmung mit Paz et al. (5) nicht bestätigen können. Der Befund eines unveränderten Testisgewichtes ist

auch durchaus kompatibel mit der erheblichen Reduktion an Leydig-Zellen um 49 % in unseren Versuchen - andere Quellen sprechen hinsichtlich der Leydig-Zell-Zahl von unverändert bis leicht vermindert (4), deutlich vermindert (1, nicht STR) bis zu um 49 % bzw. 66 % vermindert (5, 37) -, denn der Rattenhoden enthält nur 1,7 % Leydig-Zellen (19). Es muß allerdings bedacht werden, daß außer der Reduktion an Leydig-Zellen auch von z.T. erheblichen Atrophien der Tubuli seminiferi berichtet wird (4), die u.U. auch eine Verminderung des Testisgewichtes zur Folge haben können, dies jedoch erst bei relativ langer Versuchsdauer bis zu 13O Tagen.

Als eine mögliche Ursache für die reduzierte Zahl an Leydig-Zellen ist die verminderte Sekretion von LH aus der Hypophyse zu nennen (5, 8, 17, entsprechend 1o bei Alloxandiabetes). Es ist bekannt, daß nach LH-Stimulation die Zahl der Leydig-Zellen zunimmt (12, 39), und zwar sowohl durch Differenzierung aus sog. Vorläuferfibroblasten als auch durch mitotische Teilung (39). Wegfall bzw. Verminderung dieser Stimulation führt, wie aus Untersuchungen am hypophysektomierten Tier bekannt ist (4o), zu einem Rückgang der Zahl ausdifferenzierter, funktionstüchtiger Leydig-Zellen.

7.3 Zeitverlauf der Testosteronsynthese nach hCG-Stimulation

Daß neben der verminderten Zahl an Leydig-Zellen als Ursache für die niedrigen peripheren Blutspiegel des Testosterons noch ein weiterer Faktor, eine Störung im Testosteronsyntheseprozeß der einzelnen interstitiellen Zelle nach Stimulation mit hCG, eine Rolle

spielt, haben bereits Paz et al. (5) erkannt; sie berufen sich dabei auf den Befund, daß die Verminderung der Testosteron-Blutspiegel ausgeprägter sei als der Verlust an interstitiellen Zellen, wobei sie allerdings, da sie mechanisch isoliertes Interstitium für ihre Versuche benutzt haben,keine zuverlässige Auskunft über die genaue Zahl an Leydig-Zellen geben. Wir können, bei genauer Kenntnis der Zellzahlen, diesen Befund bestätigen, der Unterschied zwischen Verminderung der Zellzahl und Verminderung der Testosteronspiegel fällt aber durchaus nicht so deutlich aus wie von Paz et al. (5) angegeben.

Da bisher keine anderen Arbeiten über den Zeitverlauf der Testosteronsynthese von Leydig-Zellen diabetischer Ratten auf hCG-Stimulierung in vitro vorliegen, ist ein Vergleich mit anderen Publikationen nur bezüglich der Testosteronsynthese von Leydig-Zellen nichtdiabetischer Ratten möglich. Die von uns beobachtete Latenzzeit von ca. 1/2 Stunde bis zum Ansprechen der Testosteronsynthese auf den Stimulus LH wird auch von Moyle et al. (41) berichtet; ebenso wird in dieser Arbeit bestätigt, daß der maximale Anstieg in der Syntheserate zwischen 1 und 2 Stunden nach Beginn der Inkubation erfolgt. Moyle et al. (41) beobachten danach aber wieder ein deutliches Absinken der Testosteronproduktion in vitro, während wir eine weitere Zunahme bis zum Ende der Inkubation nach 7,5 Stunden registrieren, auch wenn die Kurve nach 3 Stunden erheblich abflacht. Die Ursache liegt, wie bereits diskutiert und wie auch von Moyle et al. (41) angenommen, wahrscheinlich in verstärktem Abbau des Testosterons zu nicht mit dem Radioimmunoassay erfaßbaren Steroiden. Da in den Moyle'schen Versuchen

die Zellzahl pro Ansatz ($1{,}4 \times 10^7$/ca. $1{,}4 \times 10^6$ Leydig-Zellen) wesentlich höher liegt als in unseren Versuchen (2×10^5 Zellen/$1{,}8 \times 10^5$ Leydig-Zellen), sind auch die Testosteronkonzentrationen im Ansatz dort deutlich höher. Aus beiden Gründen - höhere Zellzahlen und daher auch höhere erreichte Testosteronkonzentrationen - ist es durchaus erklärlich, daß Moyle et al. im weiteren Verlauf ihrer Versuche einen erheblichen Testosteronabbau sehen, der nach van Beurden et al. (42) bei adulten Ratten vorwiegend in Richtung Androstendion geht, also gar kein Abbau im eigentlichen Sinne ist, sondern die Rückreaktion der 17β -Hydroxysteroid-dehydrogenase.

Leydig-Zellen diabetischer Ratten zeigen bei Inkubation unter identischen Bedingungen (Zellzahl, hCG-Konzentration) gegenüber den Kontrollen die schon von Paz et al. (5) beobachtete Verminderung der Syntheseleistung: bei unseren Versuchen liegen nach 2-stündiger in vitro-Inkubation der Leydig-Zellen die Testosteronspiegel im Ansatz um mehr als 75 % niedriger als die der Kontrollen, Paz et al. (5) messen sogar eine Reduktion auf 14 % gegenüber Leydig-Zellen unvorbehandelter Versuchstiere. Zusätzlich fällt aber besonders die V E R Z Ö G E R U N G im Ablauf der Testosteronantwort auf hCG auf: Leydig-Zellen drei Wochen diabetischer Ratten zeigen erst im Verlauf der dritten Stunde der Inkubation ihre maximale Syntheserate, Leydig-Zellen 6 Wochen diabetischer Tiere sogar erst jenseits der dritten Stunde. Die erwähnte Latenzzeit ist also auf 2 bzw. gut 3 Stunden verlängert, wodurch verständlich wird, daß kurz nach Beginn der hCG-Stimulation eine starke Diskrepanz zwischen der Syntheseleistung intakter und diabetesgeschädigter Leydig-

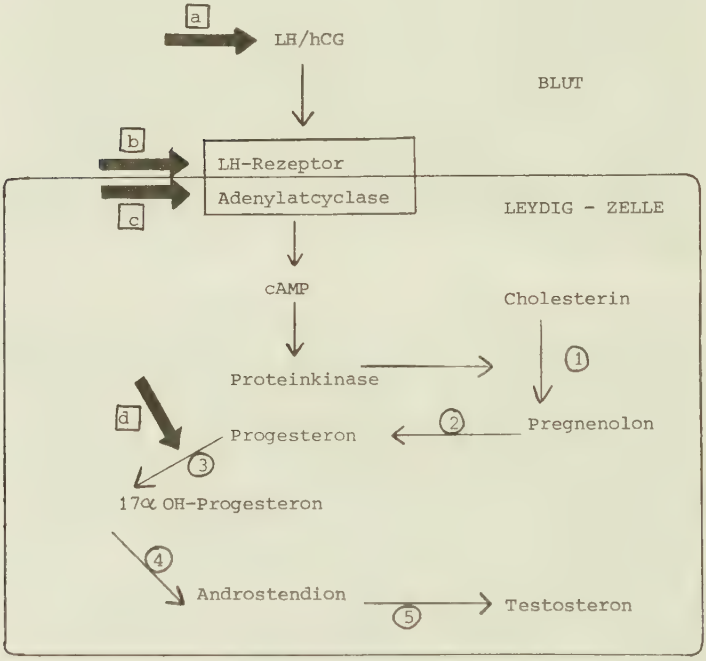
Zellen besteht, während gegen Ende der Inkubation die Unterschiede in der Produktion weniger deutlich ausfallen. Auf welchen Mechanismus die Verzögerung der Testosteronantwort von Leydig-Zellen auf hCG exakt zurückzuführen ist, ist unklar; darüber hinaus ist zu berücksichtigen, daß der intrazelluläre Abbau des Testosterons (bzw. die erwähnte Rückreaktion) ebenfalls verzögert ablaufen könnten und daß die in den Ansätzen mit diabetischen Ratten erreichten Testosteronspiegel wohl zu gering sind, als daß eine Weiterverstoffwechslung quantitative Bedeutung erlangen könnte.

Es liegt nun zunächst nahe, den Defekt, der zu der beschriebenen Verminderung und Verzögerung der Testosteronantwort führt, innerhalb der Kette von Ereignissen zu suchen, die die Wirkung des LH/hCG vermitteln: Besetzung des Rezeptors, Aktivierung der Adenylatcyclase, Produktion von cAMP, Aktivierung der Proteinkinase und letztlich Aktivierung des Cholesterinseitenkettenabspaltenden Enzyms (= C-2o, 22-cleavage-Enzym) (43) bzw. auch Bereitstellung von Substrat zur Androgensynthese durch Aktivierung intrazellulärer Transportvorgänge mittels Mikrofilamenten (44).Siehe hierzu Abb. 13, S. 64.

Die bereits erwähnten verminderten LH-Serumspiegel STR-diabetischer Ratten (5, 8, 17) können wir als direkte Ursache außer Acht lassen, da in unseren in vitro Experimenten durch einheitliche Einstellung auf $1o^{-6}$ bzw. $1o^{-9}$ g hCG/ml Inkubationsmedium dieser Faktor ausgeschlossen wird. Doch soll nicht unerwähnt bleiben, daß die hypophysären Hormone, deren Verminderung im Serum offenbar auf einer Sekretions- und

ABBILDUNG 13

ANGRIFFSPUNKTE DES DIABETES MELLITUS AN REGULATION UND ABLAUF DER TESTOSTERONSYNTHESE STREPTOZOTOZIN-DIABETISCHER RATTEN (SCHEMATISCH)



Verwendete Symbole: ➡ : nachgewiesene Veränderung

a : Verminderung der LH - Serumspiegel (5,8,17) ;

b : Reduktion der Rezeptorzahl (26) ; c : Verminderung der cAMP - Synthese nach hCG - Stimulation (46) ;

d : Funktionsbeeinträchtigung der 17α-Hydroxylase

Beteiligte Enzyme (für EC Numerierung siehe S. 68)

1) C 20, 22 Cleavage - Enzym [EC 1.14.15.x] ;

2) 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase / 3-Oxosteroid-4,5-Isomerase ; 3) 17α-Hydroxylase ; 4) C 17,20 Lyase

5) 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase

nicht auf einer Synthesestörung beruht (5), im Rahmen der diabetischen Fertilitätsstörung sicherlich insofern eine gewichtige Rolle spielen, als in vivo die Stimulation der Testes vermindert ist. Als Bestätigung dessen kann man anführen, daß Foglia et al. (3) bei pankreatektomierten, Oksanen (4) bei STR-diabetischen Ratten sowie auch Cusan et al. (1o) bei Alloxan-diabetischen Ratten einheitlich die mangelnde hypothalamisch-hypophysäre Stimulation als Ursache der Gonadenatrophie in den Vordergrund stellen, zumal sich beim Vergleich ihrer Befunde mit Beobachtungen anderer Autoren (z.B. 18) an hypophysektomierten Tieren einige deutliche Parallelen ziehen lassen.

Für Störungen auf der Ebene des Gonadotropinrezeptors an der Leydig-Zell-Oberfläche sprechen die Ergebnisse von Charreau et al. (26), die eine Verminderung der Anzahl an Rezeptoren beobachtet haben. Sie haben bei pankreatektomierten Tieren eine Reduktion des Rezeptorgehaltes auf etwa 3O %, bei STR-Ratten auf 7o % der entsprechenden Kontrollwerte festgestellt. Die Rezeptoren sollen dabei in ihren physikalischen Eigenschaften (Assoziationskonstante, Sedimentationskonstante) unverändert sein; dabei kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß Veränderungen im Kohlenhydratanteil des Rezeptors zu verstärkter Inaktivierung bzw. zu verminderter Synthese desselben geführt haben. Für den Rezeptorverlust sind möglicherweise die verminderten LH-Spiegel im Diabetes verantwortlich, da laut den Angaben von Hauger et al. (32) und Träger (4o) die Gonaden nach Hypophysektomie die Fähigkeit zur LH-Bindung verlieren. Unabhängig von dieser noch fraglichen Kausalkette - verminderte LH-Spiegel führen zu verminderter Zahl an Gonado-

tropinrezeptoren auf der Leydig-Zell-Oberfläche - ist überdies ungewiß,ob der Rezeptorverlust wirklich für die verminderte Synthese von Testosteron ausschlaggebend ist, denn Dufau et al. (2o) und Mendelson et al. (45) haben in ihren Untersuchungen herausgestellt, daß schon die Belegung von nur 1 % der Rezeptoren für die maximale Stimulation der Steroidsynthese bei normalen Ratten ausreicht. Die überzähligen Rezeptoren dienen möglicherweise dazu (2o), die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, daß bei einer gegebenen Gonadotropindosis eine ausreichende Zahl von Rezeptoren besetzt wird. Dieser Befund würde die Relevanz der von Charreau et al. (26) beschriebenen Rezeptorverluste für die Testosteronsynthesestörung der STR-Ratten erheblich einschränken. Dem ist aber wiederum entgegenzusetzen, daß Leydig-Zellen STR-diabetischer Ratten nach hCG-Gabe eine deutlich verminderte cAMP-Produktion aufweisen (46), so daß letzten Endes unklar bleibt, ob die beobachteten Veränderungen der Gonaden im Diabetes zu einem gewissen Teil dem LH-Rezeptor-Adenylatcyclase-System zuzuschreiben sind.

7.4 Stimulation der Testosteronsynthese durch Dibutyryl-cAMP

Die Versuche mit membrangängigem Dibutyryl- cAMP als Stimul im in vitro-System dienen dazu, das Gonadotropinrezeptor/Adenylatcyclasesystem zu umgehen. Das Ausmaß, in dem bei 6 Wochen diabetischen Ratten die Testosteronsynthese nach maximaler Stimulation gegenüber den Kontrollen eingeschränkt ist, ist für hCG und Dibutyryl-cAMP nicht signifikant unterschiedlich. Bei Inkubationen von Leydig-Zellen nichtdiabetischer Ratten mit den entsprechenden, jeweils maximal stimulieren-

den Konzentrationen von hCG ($1o^{-6}$ g/ml) und Db-cAMP ($2 \times 1o^{-3}$ mol/l) liegen die einander sehr gut entsprechenden Syntheseraten von 121 bzw. 123 pMol/18o Min. 2,8 bzw. 4,3 fach höher als die der diabetischen Leydig-Zellen. Ist also die Verminderung der Produktion nach beiden Stimuli etwa gleich, muß man annehmen, daß die Ursache nur zu einem geringen Teil im Rezeptor-Adenylatcyclasesystem lokalisiert ist. Vielmehr kommt nun offenbar noch eine Funktionsbeeinträchtigung der Enzyme hinzu, die an der Testosteronsynthese beteiligt sind.

7.5 Präcursorstudien mit Pregnenolon und Progesteron, Zeitverlauf

Eine genauere Lokalisation einer derartigen Störung haben wir durch Studien zur Umsetzung der ^{14}C markierten Präcursoren Pregnenolon und Progesteron durch Leydig-Zellen vornehmen können. Entsprechende Versuche mit ^{14}C-Cholesterin, die wir unternommen haben, um die Stoffwechselaktivität des C-2o, 22-cleavage Enzyms im Diabetes zu bestimmen, sind nicht auswertbar, da das zugesetzte radioaktive Cholesterin aufgrund der sehr hohen intrazellulären Cholesterinkonzentration nur zu ca. 2 % verstoffwechselt wird. Etwaige Unterschiede im Umsatz wären daher in nicht meßbaren Bereichen. Möglicherweise beruht der mangelnde Einbau dieses Präcursors darauf, daß zu vermehrter Aufnahme exogenen Cholesterins die Anwesenheit von HDL-Lipoproteinen erforderlich ist (47); in Abwesenheit dieser Lipoproteine scheint es in endokrinen steroidsynthetisierenden Zellen primär zu einer Aktivierung intrazellulärer Vorräte von Cholesterinestern zu kommen.

Während 46o pMol ^{14}C-Pregnenolon in Leydig-Zellen von normalen und 6 Wochen diabetischen Ratten gleich schnell verstoffwechselt werden - die Aktivitätsverteilung in den einzelnen Metabolitenfraktionen ist zu keiner Zeit signifikant unterschiedlich -, zeigt sich beim Umsatz von 75o pMol ^{14}C-Progesteron eine erhebliche Verzögerung im Umsatz des Präcursors bei den Leydig-Zellen der diabetischen Ratten im Vergleich zu den Kontrollen. Wenn man von der Voraussetzung ausgeht, daß zeitlich aufeinanderfolgende Radioaktivitätsmaxima in den dünnschicht-chromatographisch getrennten Fraktionen in der Stoffwechselkette nacheinander erscheinende Metabolite repräsentieren (48), läßt sich der Syntheseweg vom Pregnenolon bis zum Testosteron als der sog. Δ_4-Weg identifizieren, über die Zwischenstufen Progesteron, 17α-OH-Progesteron und Androstendion. Beteiligt an dem Syntheseprozeß sind nach (4o) folgende Enzyme, die in enger räumlicher Nachbarschaft, teilweise direkt aneinander gekoppelt, in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind (vergleiche auch Abb.13, S.64):

1) 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase [EC 1.1.1.145] / 3-Oxosteroid-4,5-Isomerase [EC 5.3.3.1]

2) 17α-Hydroxylase [EC 1.14.99.9]

3) C-17,2o-Lyase [EC 4.1.2.3o]

4) 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase [EC 1.1.1.63 oder 64]

Die Abfolge der Metaboliten in unseren Experimenten entspricht den Ergebnissen von Bell et al. (48) aus Zeitverlaufstudien an Rattenhodeninterstitium,

von Chubb et al. (49) an perfundierten Rattentestes und von Tamaoki et al. (5o) an isolierten Mikrosomen aus Rattentestishomogenaten. 17α-OH-Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron (DHEA) als Indikatoren des Δ 5-Weges, der unter anderem bei Kaninchen (49) und beim Menschen (15, 4o, 51) bevorzugt ist, können in unseren Experimenten ebensowenig wie von Bell et al. (48) identifiziert werden. Lediglich Kremers (51) leitet aus einer höheren Affinität der 17 α-Hydroxylase für Pregnenolon als für Progesteron eine Bevorzugung des Δ 5-Weges auch bei Ratten ab, schränkt aber ein, daß unter in vitro-Bedingungen auch der Δ4-Weg bevorzugt sein kann.

Bei diabetischen Ratten kann der gleiche Stoffwechselweg verfolgt werden; es treten keine neuen Metaboliten hinzu, die auf ein Ausweichen der Synthese auf andere Wege hindeuten würden.

Die Umsatzgeschwindigkeit von Progesteron in Leydig-Zellen, wie sie aus der Verteilung des Präcursors in den verschiedenen Fraktionen zu verschiedenen Zeiten abzuleiten ist, entspricht bei Kontrolltieren etwa der von Bell et al. (48) angegebenen Geschwindigkeit, ist aber geringer als in Mikrosomen, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, daß bei Mikrosomenpräparationen der Transport der Steroide zu den Enzymen rascher vonstatten gehen kann als in intakten Zellen.

Bei Leydig-Zellen diabetischer Ratten ist, verglichen mit der Syntheseleistung beim Normaltier, schon der erste Reaktionsschritt - die 17α-Hydroxylierung - merklich verzögert. Zwischen den Radioaktivitäts-

maxima in der 17α-OH-Progesteron- Fraktion von nicht-diabetischen und diabetischen Leydig-Zellen besteht ein zeitlicher Abstand von ca. 45 Minuten, was auf eine erhebliche Aktivitätsverminderung der 17α - Hydroxylase schließen läßt. Da die Verzögerung im Auftreten der Radioaktivitätsmaxima der Metabolite Androstendion und Testosteron noch zuzunehmen scheint, kann man eine zusätzliche Aktivitätsminderung der C-17,2o-Lyase und 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase solange nicht ausschließen, wie nicht genaue kine - tische Daten über die beteiligten Enzyme vorliegen.

17α-Hydroxylase und C-17,2o-Lyase besitzen Cytochrom P45o als aktives Zentrum und benötigen als Coenzym NADPH (4o). Calvo et al. (17) beschreiben bei STR-diabetischen Ratten eine deutlich verminderte Aktivität NADPH-regenerierender Enzymsysteme im Testis, und zwar der Glucose-6P-Dehydrogenase, der 6-Phosphogluconatdehydrogenase und der Isocitratdehydrogenase. Durch Zusatz eines NADPH-regenerierenden Systems zum Inkubationsmedium haben sie allerdings nur eine partielle Normalisierung der Testosteronsynthese erreichen können. Man muß daher davon ausgehen, daß verminderte NADPH-Bereitstellung nur eine untergeordnete Rolle bei der partiellen Hemmung der Testosteronsynthese aus Progesteron im Diabetes mellitus spielt.

Eine Reduktion der 17α-Hydroxylase und vor allem der C-17,2o-Lyaseaktivität haben Dufau et al. (52) und Chasalow et al. (53) auch bei Untersuchungen an Leydig-Zellen finden können, in denen nach Applikation hoher exogener Dosen von hCG eine Verminderung der hcG stimulierbaren Testosteronsynthese gesehen wird, die sowohl auf verminderte Rezeptorzahl als auch auf einen

Aktivitätsverlust der genannten Enzyme zurückgeführt wird. Für die Auslösung dieser beiden Phänomene sollen allerdings zwei verschiedene Mechanismen verantwortlich sein (52). Als Ursache der verminderten Enzymaktivitäten diskutieren die Autoren (52, 53) eine Beteiligung von Östrogenen: direkte Applikation von Östradiol und Diäthylstilböstrol führt ebenfalls zu Verminderung der Testosteronsynthese (54), und zwar durch einen Block auf der Stufe von 17α-Hydroxylase und C-17,2o-Lyase (55). Ob die pathogenetische Wirkung des Diabetes mellitus auf das Leydig-Zell-System ebenfalls - zumindest teilweise - über Östrogene vermittelt wird, ist derzeit völlig unklar. Einen Hinweis allerdings könnte der Befund geben, daß im Serum diabetischer Männer erhöhte Östrogenspiegel vorliegen (1).

Zusätzliche Stimulation der Leydig-Zellen mit hCG führt in unseren Präcursorstudien nicht zu einem beschleunigten Umsatz eben dieser zugesetzten Präcursoren in vitro, weder bei den Kontrollen noch bei den Leydig-Zellen diabetischer Tiere. Die Ursache für dieses Phänomen dürfte wohl darin liegen, daß hCG/LH via cAMP zwar eine Beschleunigung des intrazellulären Cholesterintransports (44) in die Mitochondrien und die Aktivierung des C-2o,22-cleavage-Enzyms [EC 1.14.15.x] bewirkt (43), und damit vermehrt Pregnenolon bereitstellt, offensichtlich aber nicht die Umsetzung dieses Steroids selbst beschleunigt.

7.6 Umsatz verschiedener Konzentrationen der Präcursoren Pregnenolon und Progesteron

Die Messung der Umsatzraten von Pregnenolon und Progesteron jeweils in Abhängigkeit von der Konzentration der beiden Präcursoren durch Leydig-Zellen normaler und STR-diabetischer Ratten sollen zur Aufklärung des Widerspruchs dienen, daß zwar Progesteron im Diabetes gegenüber den Kontrollen verzögert, aber das in der Stoffwechselkette davor einzuordnende Pregnenolon in beiden Fällen etwa gleich schnell verstoffwechselt wird. Hier stellt sich nun heraus, daß sich im Falle beider Präcursoren nach 15-minütiger Inkubation bei einer Konzentration von etwa 25o pMol/Ansatz leichte, bei 5oo pMol und mehr pro Ansatz signifikante Unterschiede in der jeweiligen Umsatzrate zwischen Leydig-Zellen von diabetischen und nichtdiabetischen Tieren zeigen, die sich nach 2 Stunden allerdings wieder ausgleichen. Die Leydig-Zellen normaler Ratten setzen offensichtlich in Gegenwart derartiger Substratkonzentrationen die Steroide so rasch um, daß die Umsatzgeschwindigkeit V durch die Abnahme von [S] bereits in den ersten Minuten absinkt, während bei den Leydig-Zellen der diabetischen Ratten die von vornherein niedrigere V wegen der langsameren Substratabnahme erst später absinkt. Insgesamt läßt sich aus diesem Versuch ableiten, daß die Synthesekapazität des androgenbildenden Enzymsystems im Diabetes mellitus soweit herabgesetzt wird, daß bei einem akut anfallenden großen Substratangebot Verzögerungen im Ablauf der Synthese auftreten.

Diese Befunde bestätigen den verminderten Durchsatz der 75o pMol Progesteron, die wir in den Studien zur

Zeitabhängigkeit des Progesteronumsatzes als Präcursor eingesetzt haben, durch die 17α-Hydroxylase im Diabetes mellitus. Sie machen weiterhin klar, daß das Progesteron, welches als 1. Metabolit aus dem als Präcursor zugesetzten ^{14}C-Pregnenolon entsteht, ohne Verzögerung von der 17α-Hydroxylase weiterverstoffwechselt werden kann; die in den Inkubationsansätzen zu messenden Progesteronkonzentrationen gehen nämlich nicht über 14o pMol/Probe ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) hinaus. Dies ist ein Wert, bei dem noch keine Differenzen bezüglich der Umsatzgeschwindigkeit zwischen Kontrollen und diabetischen Leydig-Zellen bestehen. Andererseits ist möglicherweise auch der Schritt Pregnenolon → Progesteron, der von der 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase und der 4,5-Isomerase katalysiert wird, bei diabetischen Leydig-Zellen verzögert. Es fällt nämlich auf, daß zwar die nachfolgenden Reaktionsschritte - aufgrund der relativ niedrigen Progesteronspiegel, die im Ansatz erreicht werden - störungsfrei vonstatten gehen können, jedoch der Gesamtumsatz von Pregnenolon nicht unerheblich verlangsamt ist (Abb. 12). Dem steht allerdings der unveränderte Umsatz von Pregnenolon in den Umsatz/Zeit-Studien gegenüber (Abb. 9 und 1o). Diese trotz der hohen Varianzen auffälligen Differenzen haben wir bisher noch nicht befriedigend erklären können.

Insgesamt lassen sich an den Enzymen, die an der Testosteronsynthese in Ratten-Leydig-Zellen beteiligt sind, an mehreren Stellen Störungen als Folge des Diabetes mellitus nachweisen. Spätere Untersuchungen werden das Ausmaß für jedes Enzym einzeln abschätzen und in Relation zum Gesamtschaden setzen müssen.

8. ZUSAMMENFASSUNG

An enzymatisch isolierten und mittels Dichtegradientenzentrifugation hochangereicherten Leydig-Zellen Streptozotozin - diabetischer Ratten werden die Auswirkungen des Diabetes mellitus auf die Testosteronsynthese untersucht. Dabei werden zum einen Geschwindigkeit und Ausmaß der Testosteronproduktion von Leydig-Zellen nach Stimulation mit humanem Choriongonadotropin und cyclischem Adenosinmonophosphat innerhalb von 7,5 Stunden berücksichtigt; zum anderen werden die Umsatzraten der ^{14}C-markierten Präcursorsubstanzen Pregnenolon und Progesteron sowie ihrer Metabolite bis zum Testosteron bestimmt als Ausdruck der Funktionstüchtigkeit der testosteronsynthetisierenden Enzyme.

Anhand unserer Daten kann man eine deutliche Verzögerung und Verminderung der Testosteronsynthese diabetesgeschädigter Leydig-Zellen nach Stimulation mit hCG im Vergleich zu Leydig-Zellen nichtdiabetischer Ratten nachweisen. Desgleichen besteht auch eine Reduktion der Testosteronantwort auf Stimulation mit c-AMP. Als Ursache für diese Veränderungen findet sich auf der Ebene der steroidsynthetisierenden Enzyme eine Funktionsbeeinträchtigung der 17 α - Hydroxylase, was eine erhebliche Verzögerung der Reaktion Progesteron $\longrightarrow$ 17 α OH-Progesteron zur Folge hat. Diese Zellstoffwechselstörung führt - im Zusammenwirken mit der ebenfalls deutlichen Reduktion der Zahl an Leydig-Zellen im diabetischen Hoden - zu pathologisch niedrigen Testosteronblutspiegeln und spielt damit auch eine ursächliche Rolle bei der bekannten Fertilitätsstörung Streptozotozindiabetischer Ratten.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1) SCHÖFFLING, K.
" Diabetes and male gonadal function "
in Rodriguez, R.R.; Vallance-Owen, J.
(Eds.) Proceedings of the 7th Congress
of the International Diabetes Federation,
Buenos Aires 197o Amsterdam Excerpta medica
(1971) 36-57

2) FOGLIA, V.G.; BORGHELLI, R.F.;CHIERI,R.A.;
FERNANDEZ-COLLAZO,E.L.; SPINDLER,I.; WESELY,O.
" Sexual disturbances in the diabetic rat "
Diabetes 12 (1963) 231 - 237

3) FOGLIA, V.G.; ROSNER, J.M.; CATTANEO DE PERALTA
RAMOS, M.; LEMA, B.E.
" Sexual disturbances in the male diabetic rat "
Horm. Metab.Res. 1 (1969) 72 - 77

4) OKSANEN, A.
" Testicular lesions of Streptozotocin diabetic
rats "
Horm.Res. 6 (1975) 138-144

5) PAZ, G.; HOMONNAI, Z.T.; DRASNIN, N.; SOFER, A.;
KAPLAN, R.; KRAICER, P.F.
" Fertility of the streptozotocin- diabetic male
rat "
Andrologia 1o (1978) 127 - 136

6) JOHNSON, L.M. ; SIDMAN, R.L.

" A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse "
Biol.Reprod. 2o (1979) 552 - 559

7) HELLMANN, B.; JAKOBSSON, L.; TÄLJEDAL, I.- B.

" Endocrine activity of the testis in obese hyperglycemic mice "
Acta Endocrinol. 44 (1963) 2o - 26

8) HOWLAND, B.E. ; ZEBROWSKI, E.J.

" Some effects of experimentally induced diabetes on pituitary-testicular relationships in rats "
Horm.Metab.Res. 8 (1976) 465 - 469

9) HUNT, E.L.; BAILEY, D.W.

" The effects of alloxan diabetes on the reproductive system of young male rats "
Acta Endocrinol. 38 (1961) 432 - 44o

1o) CUSAN, L. ; BELANGER, A. ; SEGUIN, C. ; LABRIE, F.

" Impairment of pituitary and gonadal function in alloxan-induced diabetic male rats "
Mol.Cell.Endocrinol. 18 (1980) 165 - 176

11) RUDAS, B.

" Streptozotocin "
Arzneim.Forsch. 22 (1972) 83o-861

12) CHRISTENSEN, A.K.

" Leydig cells "
in: Handbook of Physiology (GEIGER, S.R., Executive Ed.), Sect. 7, Vol. 5: Male reproductive system (1975) Am. Physiol.Soc., Washington D.C., Chapt. 3, 57 - 94

13) CHRISTENSEN, A.K. ; MASON, N.R.

" Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-^{14}C in vitro "
Endocrinology 76 (1965) 646 - 656

14) HALL, P.F. ;IRBY, D.C.; DE KRETSER, D.M.

" Conversion of cholesterol to androgens by rat testes: comparison of interstitial cells and seminiferous tubules "
Endocrinology 84 (1969) 488 - 496

15) EIK-NES, K.B.

" Biosynthesis and secretion of testicular steroids "
in: Handbook of Physiology (GEIGER, S.R., Ed.) Sect. 7 Vol. 5: Male reproductive system (1975) Am. Physiol.Soc.,Washington, D.C., Chapt. 4, 95 - 109

16) TESONE, M.; OLIVEIRA-FILHO, R.M. ; BIELLA DE SOUZA VALLE, L.; CALVO,J.C. ; BARANAO, J.L.S.; FOGLIA, V.G.; CHARREAU, E.H.

" Androgen receptors in the diabetic rat "
Diabetologia 18 (1980) 385 - 390

17) CALVO, J.C.; BIELLA DE SOUZA VALLE, L.; BARANAO, J.L.S.; TESONE, M.; CHARREAU, E.H.

" NADPH-generating enzymes in Leydig cells from diabetic rats "
Horm. Metab. Res. 11 (1979) 161 - 164

18) CLERMONT, Y.; MORGENTHALER, H.

"Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat"
Endocrinology 57 (1955) 369 - 382

19) ROOSEN-RUNGE, E.C.

"Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat: 3. Volume changes in the cells of the seminiferous tubules"
Anat.Rec. 123 (1955) 385 - 398

2o) DUFAU, M.L.; CATT, K.J.

"Gonadotropic stimulation of interstitial cell functions of the rat testis in vitro"
Methods in Enzymology 39 (1975) 252 - 272

21) ROMMERTS, F.F.G.; VAN DOORN, L.G.; GALJAARD, H.; COOKE, B.A.; VAN DER MOLEN, H.J.

"Dissection of wet tissue and of freeze-dried sections in the investigations of seminiferous tubules and interstitial tissue from rat testis"
J.Histochem.Cytochem. 21 (1973) 572 - 579

22) JANSZEN, F.H.A.; COOKE, B.A.; VAN DRIEL, M.J.A.; VAN DER MOLEN, H.J.

"Purification and characterization of Leydig cells from rat testes"
J.Endocrinol. 7o (1976) 345 - 359

23) CONN, P.M.; TSURUHARA, T.; DUFAU, M.L.; CATT, K.J.

"Isolation of highly purified Leydig cells by density-gradient centrifugation"
Endocrinology 1o1 (1977) 639 - 642

24) SCHUMACHER, M.; SCHÄFER, G.; HOLSTEIN, A.F.; HILZ, H.

"Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in Percoll^{R}-density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity"
FEBS Lett. 91 (1978) 333 - 338

25) BROWNING, J.Y.; d'AGATA, R.; GROTJAN, H.E.

"Isolation of purified rat Leydig cells using continuous Percoll^{R}-gradients"
Endocrinology 1o9 (1981) 667 - 669

26) CHARREAU, E.H.; CALVO, J.C.; TESONE, M.; BIELLA DE SOUZA VALLE, L.; BARANAO, J.L.S.

"Insulin regulation of Leydig cell luteinizing hormone receptors"
J. Biol.Chem. 253 (1978) 25o4 - 25o6

27) LEVY, H.; WENDLER DEANE, H.; RUBIN, B.L.

"Visualization of steroid 3β-ol dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats"
Endocrinology 65 (1959) 933 - 943

28) WIEBE, J.P.

"Steroidogenesis in rat Leydig cells: changes in activity of 5-ane and 5-ene 3β-hydroxysteroiddehydrogenase during sexual maturation"
Endocrinology 98 (1976) 5o5 - 513

29) LOJDA, Z.; GOSSRAU, R.; SCHIEBLER, T.

"Enzymhistochemische Methoden"
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1976)

3o) KÜHN-VELTEN, N.; WOLFF, J.; PASSIA, D.; STAIB, W.

"Determination of nonspecific esterase activity in rat testis interstitial cells: a marker for evaluation of a Leydig cell purification procedure and of cell viability during incubation and continuous superfusion"
Cell.Mol.Biol. (1982) im Druck

31) NIESCHLAG, E.; LORIAUX, D.L.

"Radioimmunoassay for plasma testosterone"
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 1o (1972) 164 - 168

32) HAUGER, R.L.; CHEN, Y.-D.I.; KELCH, R.P.
PAYNE, A.H.

"Pituitary regulation of Leydig cell function in the adult male rat"
J.Endocrinol. 74 (1977) 57 - 66

33) DUFAU, M.L.; CATT, K.J.; TSURUHARA, T.

"Gonadotrophin stimulation of testosterone production by the rat testis in vitro"
Biochim.Biophys.Acta 252 (1971) 574 - 579

34) MOGER, W.H.

"Production of testosterone, 5α-androstane-3α, 17β diol and androsterone by dispersed testicular interstitial cells and whole testes in vitro"
J. Endocrinol. 8o (1979) 321 - 332

35) SHARPE, R.M.; MC NEILLY, A.S.

"Differences between dispersed Leydig cells and intact testes in their sensitivity to gonadotrophin stimulation in vitro after alteration of LH receptor numbers"
Mol.Cell.Endocrinol. 18 (1980) 75 - 86

36) PAYNE, A.H.; DOWNING, J.R.; WONG, K.L.

"Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells"
Endocrinology 106 (1980) 1424 -1429

37) PAZ, G.; HOMONNAI, Z.T.

"Leydig cell function in streptozotocin-induced diabetic rats"
Experientia 35 (1979) 1412 - 1413

38) PAZ, G.; HOMONNAI, Z.T.,; HARELL, A.; KRAICER,P.F.

"Improvement in the fertility of streptozotocin-diabetic male rats following treatment with insulin and human chorionic gonadotropin"
Isr.J.Med.Sci. 14 (1978) 1073 - 1078

39) CHEMES, H.E.; RIVAROLA, M.A.; BERGADA, C.

"Effect of LH on the interstitial cells and androgen production in the immature rat testis"
J.Reprod.Fertil. 46 (1976) 279 - 282

40) TRÄGER, L.

"Steroidhormone"
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1977)

41) MOYLE, W.R.; RAMACHANDRAN, J.

"Effect of LH on steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in rat Leydig cells and mouse tumor Leydig cells"
Endocrinology 93 (1973) 127 - 134

42) VAN BEURDEN, W.M.O.; ROODNAT, B.; DE JONG, F.H.; MULDER, E.; VAN DER MOLEN, H.J.

"Hormonal regulation of LH-stimulation of testosterone production in isolated Leydig cells of immature rats: the effect of hypophysectomy, FSH and estradiol-17β"
Steroids 28 (1976) 847 - 866

43) BARTKE, A.; HAFIEZ, A.A.; BEX, F.J.; DALTERIO, S.

"Hormonal interactions in regulation of androgen secretion"
Biol.Reprod. 18 (1978) 44 - 54

44) HALL, P.F.; CHARPONNIER, C.; NAKAMURA, M.; GABBIANI, G.

"The role of microfilaments in the response of Leydig cells to luteinizing hormone"
J.Ster.Biochem. 11 (1979) 1361 - 1366

45) MENDELSON, C.; DUFAU, M.L.; CATT, K.J.

"Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3′, 5′-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells"
J.Biol.Chem. 25o (1975) 8818 - 8823

46) KÜHN-VELTEN, N.; WALDENBURGER, D.; STAIB, W.

" Evaluation of steroid biosynthetic lesions in isolated Leydig cells from the testes of streptozotocin-diabetic rats "
Diabetologia 23 (1982) 529 - 533

47) ANDERSEN, J.M. ; DIETSCHY, J.M.

" Regulation of sterol synthesis in 15 tissues of rats "
J. Biol.Chem. 252 (1977) 3652 - 3659

48) BELL, J.B.G.; VINSON, G.P.; HOPKIN, D.J. ; LACY, D.

" Pathways for androgen biosynthesis from [7α-^{3}H] pregnenolone and [4-^{14}C] progesterone by rat testis interstitium in vitro "
Biochim.Biophys.Acta 164 (1968) 412 - 42o

49) CHUBB, C.; EWING, L.L.

" Steroid secretion by in vitro perfused testes: testosterone biosynthetic pathways "
Am.J.Physiol. 237 (1979) E247 - E252

5o) TAMAOKI, B.; SHIKITA, M.

" Biosynthesis of steroids in testicular tissue in vitro "
in: Steroid dynamics (PINCUS, G.; NAKAO, T.; TAIT,J.F., Eds.)
Academic Press New York, London (1966) 493 - 528

51) KREMERS, P.

" Progesterone and pregnenolone 17α-hydroxylase: substrate specifity and selective inhibition by 17α-hydroxylated products "
J. Ster. Biochem. 7 (1976) 571 - 575

52) DUFAU, M.L.; CIGORRAGA, S.-B.; BAUKAL, A.J.; BATOR, J.M.; SORRELL, S.H.; NEUBAUER, J.F.; CATT, K.J.

"Steroid biosynthetic lesions in gonadotropin desensitized Leydig cells"
J.Ster.Biochem. 11 (1979) 193 - 199

53) CHASALOW, F.; MARR, H.; HAOUR, F.; SAEZ, J.M.

"Testicular steroidogenesis after human chorionic gonadotropin desensitization in rats "
J.Biol.Chem. 254 (1979) 5613 - 5617

54) BARTKE, A.; WILLIAMS, K.I.H.; DALTERIO, S.

"Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro"
Biol.Reprod. 17 (1977) 645 - 649

55) BRINKMANN, A.O.; LEEMBORG, F.G.; ROODNAT, B.M.; DE JONG, F.H.; VAN DER MOLEN, H.J.

"A specific action of estradiol on enzymes involved in testicular steroidogenesis"
Biol.Reprod. 25 (198o) 8o1 - 8o9

DANKSAGUNG

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Wolfgang Staib meinen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für seine ständige Anteilnahme an den Versuchen.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. Nikolaus Kühn-Velten, der mich in das Arbeitsgebiet einführte und mir sowohl während der Versuche als auch bei der Abfassung des Manuskripts stets unverzüglich mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Frau M. Vujicic, die mir durch ihr immer freundliches Wesen und ihre unermüdliche aktive Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche sehr geholfen hat.

Nicht zuletzt danke ich auch Herrn Dr. U. Matthiesen und Herrn Dr. F. Susanto für die massenspektrometrische Identifizierung einiger Steroide.

LEBENSLAUF

Am 15.11.1956 wurde ich als Sohn des Ltd. Verw.-Direktors Hans Waldenburger und seiner Ehefrau Maria Waldenburger, geb. Bermel, in Duisburg geboren.

Von 1963 bis 1967 besuchte ich die Kath. Volksschule an der Bismarckstraße in Duisburg. Anschließend war ich vom Herbst 1967 bis zum Frühjahr 1976 Schüler des humanistischen Landfermann-Gymnasiums in Duisburg. Dort erwarb ich am o1.o6.1976 das Reifezeugnis.

Vom o1.o7. bis 17.1o.1976 erhielt ich die Grundausbildung bei der Bundeswehr als Sanitätssoldat. Nachfolgend wurde ich vom Wehrdienst beurlaubt und trat zum Wintersemester 1976/77 das Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf an.

Im März und im September 1977 absolvierte ich mein Krankenpflegepraktikum auf der inneren bzw. chirurgischen Abteilung des St. Anna Krankenhauses, Duisburg. Am 25. August 1978 bestand ich an der Universität Düsseldorf die ärztliche Vorprüfung. Im September 1978 war ich als Famulus in der Praxis des Internisten Dr. Heede in Düsseldorf tätig, im März 1979 famulierte ich in der chirurgischen Abteilung der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau. Den 1. Teil der ärztlichen Prüfung legte ich am 3o. August 1979 ab. Im März und im September 198o famulierte ich in den inneren Abteilungen des Liebfrauen-Krankenhauses in Düsseldorf und des Kreiskrankenhauses in Neustadt/Holstein. Am 21.o8.1981 bestand ich den 2. Teil der ärztlichen Prüfung.

Das praktische Jahr absolvierte ich in der Zeit von Oktober 1981 bis August 1982 im St. Johannes-Hospital, Duisburg-Hamborn, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Düsseldorf, auf der chirurgischen, inneren und pädiatrischen Abteilung. Am o5.1o. bzw. 26.1o.1982 bestand ich den schriftlichen bzw. mündlichen Teil der ärztlichen Prüfung und schloß nach 12 Semestern an der Universität Düsseldorf das Studium ab.

Die Approbation als Arzt wurde mir am 15.11.1982 erteilt.

Seit dem o3.o1.1983 bin ich zur Ableistung meines restlichen Grundwehrdienstes eingezogen worden und als Stabsarzt bei der Marine eingesetzt.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353